

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL: DESARROLLO DE
ESTRATEGIAS BIOTECNOLOGICAS PARA LA
REMEDIACIÓN DE METALES PESADOS

LDA: PATRICIA PÉREZ PALACIOS

SEVILLA, 2015

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	pág.
1. Panorama pasado y actual de la contaminación mundial	pág.
2. Contaminación por metales pesados	pág.
3. Mecanismos moleculares para la tolerancia y homeostasis de los metales pesados en plantas	pág.
3.1 Bloqueo de la entrada y transporte de los metales pesados	pág.
3.2 Quelantes de metales pesados	pág.
3.3 Proteínas de choque térmico	pág.
3.4 Síntesis de prolina	pág.
3.5 Poliaminas (Pas)	pág.
3.6 Polifenoles	pág.
3.7 Sistema antioxidante: Enzimas y componentes no enzimáticos antioxidantes	pág.
4. El Zinc y la vida	pág.
5. Cobre: De esencial a tóxico	pág.
6. Arsénico. Un tóxico muy expandido	pág.
7. Métodos físico-químicos para la eliminación de metales pesados de la biosfera	pág.
8. Biorremediación. Una nueva estrategia para la contaminación del medio ambiente	pág.
9. Fitorremediación como futuro en biorremediación	pág.
9.1 Cuantificación de la eficiencia en la fitoextracción	pág.
9.2 Limitaciones en la fitorremediación	pág.
9.3 El futuro en la fitorremediación	pág.
SUMMARY	pág.
1. Abstract	pág.
2. Methodology	pág.
3. Results	pág.
4. Discussion	pág.
OBJETIVOS	pág.
MATERIALES Y MÉTODOS	pág.

1. Organismos.....	pág.
2. Material genético.....	pág.
3. Medios de cultivo y mantenimiento.....	pág.
4. Plantas.....	pág.
5. Técnicas de biología molecular.....	pág.
6. Transformaciones bacterianas.....	pág.
7. Generación del material transgénico.....	pág.
8. Condiciones de exposición de las plantas a los metales pesados.....	pág.
9. Medición de la acumulación de metales pesados en tejido seco vegetal.....	pág.
10. Estudios de estrés oxidativo.....	pág.
11. Técnicas de “microarrays”.....	pág.
12. Caracterización de polifenoles mediante técnica de Q-TOFF.....	pág.
13. Análisis estadísticos.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 1

INTRODUCCIÓN.....	pág.
RESULTADOS.....	pág.
1. Expresión transgénica de <i>mt4a</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	pág.
2. Influencia de la sobreexpresión de <i>mt4a</i> en la germinación de las semillas de <i>A. thaliana</i> en presencia de Cu o Zn.....	pág.
3. Influencia de la expresión de <i>mt4a</i> en tejidos vegetales sobre la tolerancia a Cu y Zn de plantas de <i>A. thaliana</i>	pág.
4. Tolerancia y acumulación de Cu y Zn en plantas transgénicas maduras de <i>A. thaliana</i>	pág.
DISCUSIÓN.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 2.....

INTRODUCCIÓN.....	pág.
RESULTADOS.....	pág.
1. Confirmación de la transgénesis de las raíces de <i>M. truncatula</i>	pág.
2. Estudios de la nodulación y de los parámetros fisiológicos de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i> expuestas a diferentes concentraciones de Cu.....	pág.
3. Ensayos de acumulación de Cu en plantas compuestas de <i>M. truncatula</i>	pág.
4. Medición de parámetros de estrés oxidativo para la comprobación de la mejora de tolerancia a Cu en plantas compuestas de <i>M. truncatula</i>	pág.
5. Sobreexpresión de los genes ERN y ENOD12 en raíces de plantas compuestas de <i>M. truncatula</i> para la mejora de la nodulación frente a As.....	pág.
DISCUSIÓN.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 3	pág.
INTRODUCCIÓN	pág.
RESULTADOS	pág.
1. Generación de las RT que expresan el gen <i>copC</i> (“COPPER-ROOTS”).....	pág.
2. Acumulación de cobre en las raíces “COOPER-ROOTS”.....	pág.
3. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica de las diferentes líneas de RT en respuesta a Cu.....	pág.
4. Generación de las RT que expresan el gen <i>arsB</i> (“ARS-ROOTS”).....	pág.
5. Acumulación de As en las “Ars-ROOTS”.....	pág.
5.1 Acumulación a distintas concentraciones de arsenito sódico.....	pág.
5.2 Acumulación a distintas concentraciones de arseniato sódico.....	pág.
5.3 Estrategias para aumentar la acumulación de arseniato y arsenito sódico en RTs.....	pág.
5.4 Factor de bioconcentración del control HR y de las Ars-ROOTS.....	pág.
6. Estudios de “microarrays” de RTs expuestas a arsenito sódico.....	pág.
6.1 Análisis preliminar de los datos obtenidos en los “microarrays”.....	pág.
6.2 Análisis transcriptómico de la exposición a As de las diferentes “Ars-Roots”.....	pág.
6.3 Validación de los resultados obtenidos en los “microarrays”.....	pág.
6.4 Meta-análisis de los genes modulados por la exposición de RTs de <i>N. tabacum</i> a As (III).....	pág.
6.5 Meta-análisis de los genes modulados por la expresión del gen <i>arsB</i> de RTs de <i>N. tabacum</i> expuestas a As (III).....	pág.
7. Estudios en la gestión del estrés de RTs de <i>N. tabacum</i> producido por la exposición a As.....	pág.
7.1 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes y de la peroxidación lipídica en las diferentes líneas de RT en respuesta a As.....	pág.
7.2 Ensayos de actividad antioxidante de RTs frente a arsénico. Extracción de polifenoles totales y caracterización de estos mediante técnicas HPLC-MS/MS.....	pág.
7.3 Determinación de la cantidad de glutatión total en RTs de tabaco.....	pág.
DICUSIÓN	pág.
CONCLUSSIONS	pág.
BIBLIOGRAFÍA	pág.

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.....	pág.
Figura 2.....	pág.
Figura 3.....	pág.
Figura 4.....	pág.
Figura 5.....	pág.
Figura 6.....	pág.
Figura 7.....	pág.
Figura 8.....	pág.
Figura 9.....	pág.
Figura 10.....	pág.

HERRAMIENTABIOTECNOLÓGICA 1

Figura 1.....	pág.
Figura 2.....	pág.
Figura 3.....	pág.
Figura 4.....	pág.
Figura 5.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 2

Figura 1.....	pág.
Figura 2.....	pág.
Figura 3.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 3

Figura 1.....	pág.
Figura 2.....	pág.
Figura 3.....	pág.
Figura 4.....	pág.
Figura 5.....	pág.
Figura 6.....	pág.
Figura 7.....	pág.
Figura 8.....	pág.
Figura 9.....	pág.

Figura 10	pág.
Figura 11	pág.
Figura 12	pág.
Figura 13	pág.
Figura 14	pág.
Figura 15	pág.
Figura 16	pág.
Figura 17	pág.
Figura 18	pág.
Figura 19	pág.
Figura 20	pág.
Figura 21	pág.
Figura 22	pág.
Figura 23	pág.
Figura 24	pág.
Figura 25	pág.
Figura 26	pág.
Figura 27	pág.
Figura 28	pág.
Figura 29	pág.
Figura 30	pág.
Figura 31	pág.
Figura 32	pág.
Figura 33	pág.
Figura 34	pág.
Figura 35	pág.
Figura 36	pág.
Figura 37	pág.
Figura 38	pág.
Figura 39	pág.
Figura 40	pág.

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.....	pág.
Tabla 2.....	pág.
Tabla 3.....	pág.
Tabla 4.....	pág.
Tabla 5.....	pág.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1.....	pág.
Tabla 2.....	pág.
Tabla 3.....	pág.
Tabla 4.....	pág.
Tabla 5.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 1

Tabla 1.....	pág.
Tabla 2.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 2

Tabla 1.....	pág.
Tabla 2.....	pág.
Tabla 3.....	pág.

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 3

Tabla 1.....	pág.
Tabla 2.....	pág.
Tabla 3.....	pág.
Tabla 4.....	pág.
Tabla 5.....	pág.
Tabla 6.....	pág.
Tabla 7.....	pág.
Tabla 8.....	pág.
Tabla 9.....	pág.

INTRODUCCIÓN

1. PANORAMA PASADO Y ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN MUNDIAL

La industrialización global tan veloz (en su gran mayoría sin una adecuada planificación) que vivimos en estos días, supone la liberación de gran cantidad de contaminantes a la biosfera, que amenazan la salud humana y el medio ambiente. El peligro potencial de la contaminación ha sido reconocido desde hace años por muchos organismos (OPS, Organización Panamericana de la Salud, 1990) y en la actualidad sigue siendo causa de preocupación por muchos gobiernos y organismos internacionales que ya han puesto en marcha planes para paliar los efectos que se producen en el medio ambiente, como la Comisión de la ONU para el Desarrollo Sostenible <http://www.un.org/spanish/esa/sustdev/csd.htm>. El uso de materiales que contienen contaminantes medioambientales aumenta de forma alarmante produciendo efectos nocivos en el medio ambiente e incluso en algunos casos llegando a romper ciclos biogeoquímicos naturales (Friedl y Wüest, 2002). El almacenamiento no adecuado de desechos de origen industrial ha generado problemas de contaminación ambiental, debido a que estos residuos se dispersan en el ambiente o se acumulan en sedimentos y agua (Giusti, 2009).

La naturaleza de los contaminantes ambientales puede ser muy variada. Debido a esto, la EPA (“Environmental Protection Agency”, Estados Unidos) publica una lista de los principales compuestos tóxicos en los que se pueden encontrar hasta unas 6.000 sustancias nocivas para el ser humano y para el medio ambiente. Estas sustancias son los llamados compuestos PBT (“Persistent Bioaccumulative and Toxic Pollutants”).

Entre los contaminantes más abundantes en el medio y que son más perjudiciales para los sistemas biológicos se pueden encontrar desde metales pesados hasta sustancias orgánicas como plaguicidas, hidrocarburos tanto halogenados como no halogenados, bifenilos policlorados (PCBs), dibenzofurano (DBF), elementos radiactivos, etc. Su riesgo radica en su persistencia y consecuente acumulación, en la formación de asociaciones químicas complejas, en su capacidad de reacción y a veces, como consecuencia, en su toxicidad creciente.

Hay cuatro elementos clave en la estrategia de actuación de la EPA para los compuestos PBT (“PBT Strategy”), que son:

1. Elaborar e instrumentar planes de acción nacional para contaminantes PBT prioritarios, con el objetivo de reducir riesgos.
2. Examinar y seleccionar más contaminantes PBT prioritarios para actuar al respecto.
3. Prevenir la introducción de nuevos contaminantes PBT en el comercio.
4. Medir los avances vinculando las actividades con los resultados ambientales.

Un ejemplo muy cercano y relacionado con esta Tesis de cómo la contaminación industrial puede afectar y destruir el medio ambiente, es el accidente ocurrido en la mina Bolíden en la localidad sevillana de Aznalcollar el 25 de abril de 1998. En esta localidad Sevillana se produjo uno de los desastres ecológicos más graves de la historia de España en donde una balsa de residuos muy contaminantes de 8 hm³, procedentes de la mina, se rompió por dos de sus lados, liberando gran cantidad de líquido de pH muy bajo. El vertido se produjo sobre el río Agrio, afluente del Guadiamar, que fluye hacia el Parque natural de Doñana, la mayor reserva de aves de Europa. Estos residuos contenían una cantidad muy elevada de metales pesados como zinc, plomo, arsénico, cobre, antimonio, cobalto, talio, bismuto, cadmio, plata, mercurio y selenio (Tabla 1). La zona del parque Nacional de Doñana es una reserva natural de casi 106.000 ha de zona protegida situada entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz. Tanto el río Guadalquivir como el Guadiamar aportan el agua necesaria para esta reserva natural que cuenta con zonas inundadas y cultivos de arroz en la parte de la provincia de Sevilla. Cuando se produjo el accidente en la mina, los lodos acumulados bajaron por el río Guadiamar llegando hasta 60 km más allá de donde se produjo la ruptura de la balsa. A pesar de las medidas urgentes adoptadas, como la construcción de muros de contención en zonas colindantes, la superficie afectada por los lodos tóxicos alcanzó 4.286 ha de las cuales 2.557 ha estaban destinadas a la agricultura (Grimalt y col., 1999).

Tabla 1. Máxima concentración (ppm) de metales pesados encontrados en los lodos vertidos en el accidente minero en la mina de Bolíden en Aznalcollar, Sevilla (Alastuey y col., 1999)

Elemento	Concentración (ppm)
Cadmio	31
Cromo	65
Zinc	9448
Plomo	11940
Arsénico	5550
Cobre	2189

Antimonio	644
Cobalto	98
Talio	55
Bismuto	68
Plata	35
Mercurio	16.6

2. CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

Entre los muchos tipos de contaminantes existentes, los metales pesados (MP) y metaloides destacan por su elevada toxicidad y persistencia (www.epa.gov/oppt/p2home/), siendo la contaminación por estos de las más preocupantes por su difícil eliminación del medioambiente, ya que en comparación con compuestos químicos o biológicos que pueden ser degradados, estos son indestructibles. En los países desarrollados la legislación obliga a la recuperación de suelos y aguas contaminados usando métodos para disminuir su concentración en la biosfera de manera físico-química o biológica (biorremediación).

Además, los metales se encuentran presentes de forma natural en la tierra a todos los niveles, aunque en los últimos años su concentración se ha incrementado remarcablemente debido a la actividad antropogénica. La actividad humana con la agricultura y la industria han cambiado la distribución de estos, liberándolos a los ecosistemas y causando serios problemas medioambientales. Aunque muchos metales son esenciales en cantidades trazas, en mayores concentraciones son tóxicos (Rengel, 2004). Este tipo de metales son llamados oligoelementos o microelementos (Fe, Zn, Cu, Co, F, Cr, Mn, I, Mo, Se, V) y son requeridos en cantidades menores de un 0,1% siendo esenciales para los organismos, que los requieren para formación de tejidos o de diversas estructuras proteicas como la hemoglobina o las hormonas tiroideas. El problema aparece cuando la concentración aumenta ya que pueden volverse muy tóxicos y causar estrés oxidativo, especialmente los metales de transición que pueden ceder electrones en reacciones redox ($\text{Fe}^{2+/3+}$, $\text{Cu}^{+/2+}$) (Jones y col., 1991). Sin embargo, otros metales y metaloides (Pb, Cd, Hg, As, Ba, Sr, Tl, B, Al, Li, Be, Rb) son tóxicos a cualquier concentración ya que pueden reemplazar a otros metales en enzimas interrumpiendo la función de estas moléculas (Hossain y col., 2012).

Los MP, dependiendo de su estado de oxidación, pueden variar su toxicidad en las células, por eso pueden dividirse en dos grupos: los redox activos (Fe, Cu, Cr y Co)

directamente relacionados en las reacciones redox de la célula y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss y los redox inactivos (Cd, Zn, Ni, Al, As) que provocan estrés oxidativo indirectamente interaccionando con el sistema de defensa antioxidante, interrumpiendo la cadena de transporte de electrones o produciendo peroxidación lipídica (Hossain y col., 2012). A nivel molecular, pueden alterar diferentes procesos biológicos inactivando y desnaturalizando enzimas y proteínas, bloqueando y sustituyendo metales esenciales de grupos funcionales en biomoléculas y alterando la distribución de la membrana plasmática. Es más, cationes metálicos como Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} pueden desplazar al Mg^{2+} en la ribulosa-1-5-bifosfato-carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) (Wildner y Henkel, 1979), el Cd^{2+} desplaza al Ca^{2+} en la calmodulina (Rivetta y col., 1997) y el Pb puede interferir en varios pasos enzimáticos para la formación de la hemoglobina (ATSDR, 2007). Incluso pueden alterar el equilibrio redox estimulando la formación de ROS (Hossain y col., 2012). Las ROS están compuestas tanto por radicales libres como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) como por moléculas no radicales en las que se incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Sharma y col., 2012). Todas las ROS son extremadamente dañinas a altas concentraciones por lo que su producción y eliminación debe estar muy controlada ya que un aumento de éstas provoca diversos daños en biomoléculas como lípidos, proteínas y en el ADN.

3. MECANISMOS MOLECULARES PARA LA TOLERANCIA Y HOMEOSTASIS DE LOS METALES PESADOS EN PLANTAS

Frente a estos daños, las plantas han desarrollado diversos mecanismos para frenar la toxicidad de los MP entre los que se incluyen la retención de estos en la membrana plasmática, el bloqueo de la entrada y el transporte de los mismos, la síntesis de quelantes de MP (fitoquelatinas y metalotioneínas), la sobreexpresión de proteínas relacionadas con el estrés como las proteínas de choque térmico (HSP), la biosíntesis de prolina y poliaminas y moléculas señal como ácido salicílico y óxido nítrico e inducción de mecanismos que contrarresten los efectos dañinos de las ROS (Gill y Tuteja., 2010).

3.1 Bloqueo de la entrada y transporte de los metales pesados

Las plantas han desarrollado multitud de mecanismos para obtener metales esenciales del suelo así como para prevenir la entrada de los tóxicos. Por eso, tienen vastas familias de transportadores relacionados con la toma y expulsión de metales y su transporte hacia orgánulos. Entre estas familias de transportadores se encuentran distintos tipos: “heavy-metal-transporting P-type ATPase” (HMAs), “cation diffusion facilitator” (CDF), “natural resistance associated macrophage protein” (NRAMP), “iron regulated transporter-like protein” (ZIP) y “plant-specific Yellow Stripe1-Like family” (YSL) (Colangelo y Guerinot, 2006). Dependiendo del metal y de su estado de oxidación, éstos entraran por algunos de estos tipos de familias de transportadores. Mientras que los metales esenciales hacen uso de estos canales, para los tóxicos no existen canales específicos de entrada por lo que aprovechan la existencia de estos y de otros transportadores para lograr entrar en la célula desplazando en muchas ocasiones a metales u otros compuestos esenciales. Es más, Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} hacen uso de los transportadores ZIP pero también metales tóxicos como el Cd^{2+} o Ni^{2+} (Guerinot, 2000) los utilizan. Para entrar en la célula, el arsénico (As) en forma de arseniato hace uso de transportadores fosfato mientras que en forma de arsenito utiliza aquaporinas (Tripathi y col., 2012). El selenio, a su vez, hace uso de canales de sulfato debido a la similitud química que existe entre ellos (Hirai y col., 2003) (Figura 1). Aunque estas familias de transportadores también actúan en la translocación de metales a otros lugares de la planta, estos pueden ser transportados unidos a otras moléculas como la nicotinamida (NA), aminoácidos como la histidina (his), sales citrato (cit) y acetato (ace) y compuestos con grupos tioles como el glutatión. Por ejemplo, el Cu^{2+} puede ser transportado por proteínas de la familia de HMAs pero también puede ir unido a NA, el Zn^{2+} por transportadores ZIP y citrato, el Fe^{2+} y Ni^{2+} por transportadores ZIP y NA, el Pb por acetato y el As unido a grupos tioles y el Ni a his (Grotz y Guerinot 2006; Monferrán y Wunderlin, 2013) (Figura 1).

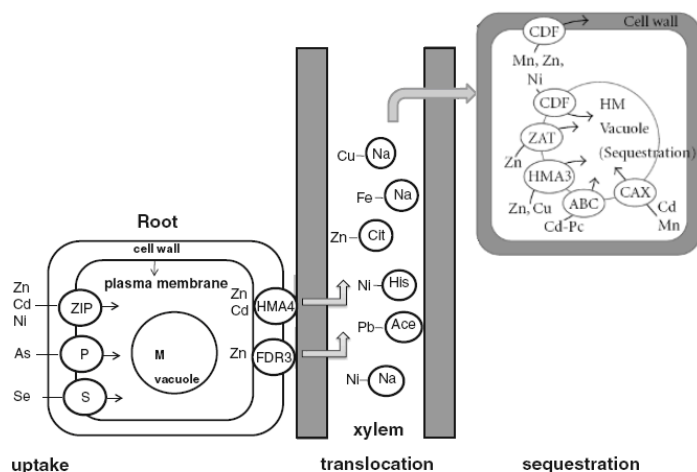


Figura 1. Esquema de los sistemas de transporte de metales relacionados con la entrada en la célula, la translocación a otras partes de la planta y la llegada a vacuolas (Monferrán y Wunderlin, 2013 con algunas modificaciones)

Uno de los primeros mecanismos que utilizan las plantas para bloquear la entrada de MP es precipitando o complejando el metal en los alrededores de la raíz, cambiando el pH de la rizosfera o exudando aniones como el fosfato (Sharma y col., 2012). Otras opciones por parte de la planta son la inclusión celular en el espacio apoplástico de la membrana, el complejamiento con la pared celular-membrana plasmática o translocándolos a otros orgánulos de almacenamiento como son las vacuolas (Hossain y col., 2012). Además la planta bloquea la transcripción de transportadores para evitar la entrada del metal a la célula (Lafuente y col., 2014).

El almacenamiento en vacuolas impide que el metal se encuentre biodisponible para reaccionar con los compuestos celulares por lo que el grado de toxicidad disminuye cuando se encuentra confinado en este orgánulo. Existen transportadores en la membrana vacuolar (tonoplasto) muy bien caracterizados como transportadores tipo NRAMP, ABC, ZIP, YSL, CAX de las mismas familias de los transportadores que se encuentran en la membrana externa y además existen bombas de protones ATPasa (V-ATPasa y V-PPasa) (Gupta y col., 2013). Estos transportadores son capaces de captar el metales libre o acomplejado con PCs, como demostró Song y col., (2010) al descubrir dos transportadores ABC en *Arabidopsis thaliana* que facilitaban el transporte de PC-As (III).

3.2 Quelantes de metales pesados

La reactividad y poca solubilidad de algunos metales hace que una vez introducidos en la célula tengan que unirse a quelantes, evitando así mayores daños dentro de la célula

al no encontrarse tan biodisponibles. Los quelantes de metales más conocidos y caracterizados en plantas son las fitoquelatinas y metalotioneínas. Aunque también existen otros como ácidos orgánicos o aminoácidos y NA.

Las fitoquelatinas (PCs) son una familia de péptidos ricos en cisteína con repeticiones del monómero $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ donde n puede ser un número entre 2 y 11 (siendo lo más común de 2 a 5) que se sintetizan a partir del glutatión reducido (GSH) por la enzima PC sintetasa (Cobbett y Goldsbrough, 2002). La biosíntesis de PCs están inducidas por los MPs, incluidos Cd, Hg, Ag, Cu, Ni, Au, Pb, As y Zn, siendo el Cd el mayor inductor de éstas (Hossain y col., 2012). Además, las fitoquelatinas pueden transportar los iones hacia las vacuolas formando dentro de estos orgánulos compuestos estabilizados al complejarse con sulfitos y ácidos orgánicos (Figura 2).

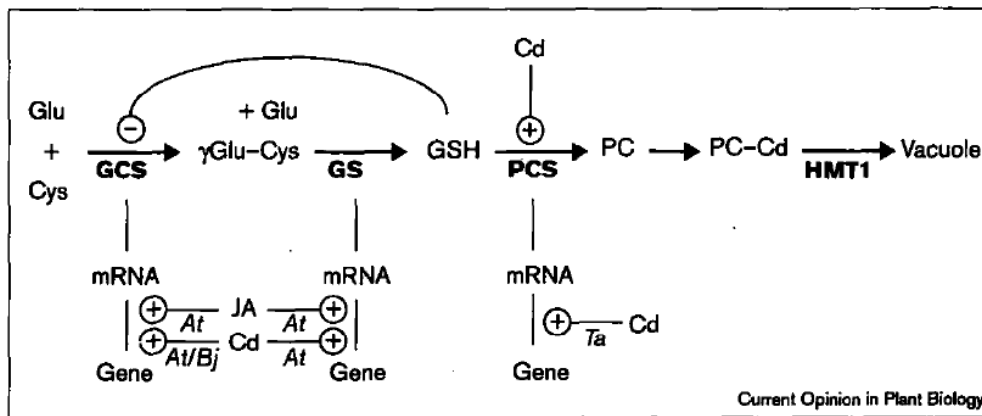


Figura 2. Ruta de producción de fitoquelatinas. Los signos (+) y (-) son puntos de regulación de la vía (Cobbett, 2000).

La primera demostración del papel de las PCs en la detoxificación de MPs, se produjo tras la caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* y *S. pombe* en una PC sintetasa, resultando más sensibles estos a diversos metales (Ha, 1999). Además del papel de detoxificador de MP, se han buscado otras funciones para las PCs relacionándolas con la homeostasis de metales y con el metabolismo de Fe o azufre aunque no se han encontrado evidencias directas de esto (Yadav, 2010).

Otro tipo de quelantes de metales descritos en plantas son las metalotioneínas (MTs). Las MTs son también proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas, que unen MP por sus grupos tioles y dichos residuos de cisteínas (Sigel y col., 2009). Aunque comparten muchas características con las PCs, su síntesis es diferente ya que están codificadas por genes, mientras que las PCs resultan de la síntesis enzimática llevada a

cabo por la PC-sintetasa. Se han encontrado genes de metalotioneínas en organismos animales, vegetales y también procariotas como *Synechococcus* (Chu y col., 2007). La primera MT identificada en plantas (trigo) fue aislada de su embrión y tenía alta afinidad por el Zn (Lane, 1987). En la actualidad han sido identificadas más de 50 MT diferentes en varios organismos vegetales.

Aunque la totalidad de las funciones de las MTs no han sido totalmente caracterizadas, se han hipotetizado algunos papeles como la participación en la homeostasis de metales, secuestro de metales tóxicos y protección frente al estrés oxidativo, siendo los mismos residuos de cys que unen metales los que pudieran unir especies ROS (Hassinen y col., 2011). En relación a la función quelante de metales, ésta ha sido puesta de manifiesto cuando se han expresado heterológicamente varias MTs en otros organismos, aumentando la tolerancia de estos cuando se exponían a metales. Por ejemplo, cuando se expresó MT tipo 1 de guisante en *E. coli*, ésta unió Cu, Cd y Zn con una mayor afinidad por Cu (Tomme y col., 1991).

Existen varias clases de MTs basadas en los residuos de cisterna de las mismas (Cobbett y Goldsbrough, 2002). En el genoma de *Arabidopsis* se encuentran hasta 9 genes que codifican MTs (Zimeri y col., 2005) clasificadas en cuatro clases según el orden y la cantidad de residuos de cisteínas con función de unir diferentes metales en plantas. Las isovariantes de MTs clase I, son necesarias en *Arabidopsis* para proteger frente a metales como el Cd, entre otros (Zimeri y col., 2005). Las MTs de clase II, sin embargo, están relacionadas con la eliminación de especies ROS en respuesta a ataques de patógenos (Wong y col., 2004). Las MT clase III tiene una alta afinidad a Cu y se encuentra sobreexpresado en plantas hiperacumuladoras de este metal como es *Thlaspi caerulescens* (Roosens y col., 2004). Las MTI y MTII a y b son expresadas en el floema de la planta, mientras que otras MTs II y MTIII se expresan mayoritariamente en células mesófilas de tejidos jóvenes y ápices de raíces. Las MTs clase IV, por otra parte, son específicas de semillas. Éstas, podrían tener función de embriogénesis y de preparación de la semilla para periodos de desecación (White y Rivin., 1995). También, proporciona a la planta un mecanismo de almacenamiento de Zn y otros metales requeridos para la germinación y el crecimiento (Kawashima y col., 1992).

Las plantas producen un amplio rango de quelantes para Al, Cd, Cu, Ni, Fe, Co y Zn. Éstos son muy reactivos con S, N y O por lo que ácidos carboxílicos y aminoácidos son

ligandos potencialmente posibles de unión a metales. Los ácidos orgánicos como el citrato, el malato y el oxalato, pueden ser excretados por las raíces de las plantas, formando compuestos muy estables con los MP cambiando la movilidad y biodisponibilidad de estos evitando así que entren en la planta. Estos ácidos orgánicos pueden quelar también MP dentro del citosol formándose complejos menos tóxicos (Hossain y col., 2012). Por otra parte, existen otro tipo de compuestos, la histidina (His) (Kerkeb y col., 2003), la nicotinamina (NA) y derivados del fosfato (Fitatos) que también son capaces de ligar MP para su transporte y para su detoxificación.

3.3 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (Heat shock proteins en inglés, HSP) fueron descubiertas en 1962 en *Drosophila melanogaster* al ser sometidas a incrementos de temperatura. En situaciones de estrés, su función es el marcaje y desnaturalización de proteínas para destruirlas luego o protegiendo a éstas manteniendo las cadenas aminoácídicas desplegadas para que una vez el estrés haya desaparecido vuelvan a sus estructuras terciarias. Aunque cualquier tipo de estrés se puede producir un incremento de este tipo de proteínas, los MPs como Zn, Cu, Cd, Hg, Al, As, Cr han sido descritos como activadores de HSP. Por ejemplo Neumann y col., (1995) estudiaron los incrementos de HSP en raíces de *Armeria maritime* que crecían en suelos ricos en Cu y Ireland y col., (2004) documentaron un aumento de la HSP-70 en algas expuestas a Cd.

3.4 Síntesis de prolina

La prolina (Pro) es un aminoácido con conformación muy rígida, esencial para el metabolismo primario. Muchas plantas acumulan prolina en respuesta a estrés (bajo condiciones de sequedad, salinidad, radiación ultravioleta, MPs, estrés oxidativo, entre otras) (Siripornadulsil y col., 2002; Szabados y Saviouré, 2010). Esta investigación se realizó con una microalga que acumulaba altos niveles de prolina en respuesta a Cd. Se cree que la prolina puede actuar como una chaperona protegiendo la integridad de proteínas y potenciando la actividad de diferentes enzimas, además de poder presentar poder antioxidante eliminando ROS (Figura 3).

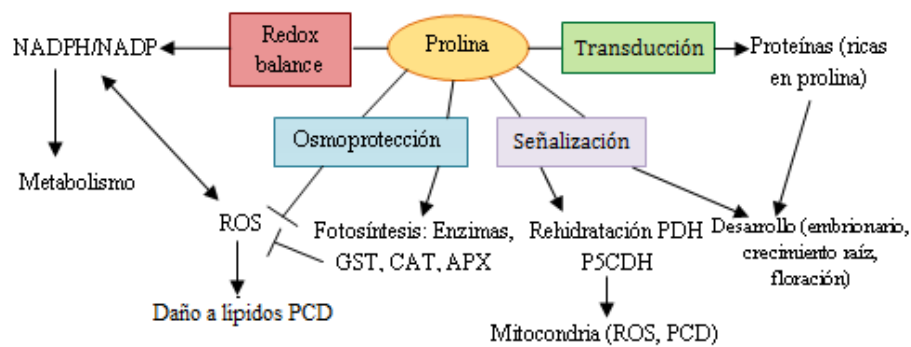


Figura 3. Interacción de la prolina con los distintos mecanismos celulares para la reducción del estrés en plantas.

3.5 Poliaminas (PAs)

Las poliaminas son pequeñas aminas alifáticas presentes en plantas, animales y microorganismos implicadas en muchos procesos como promotoras del crecimiento, división celular, replicación del ADN y diferenciación celular (Alcázar y col., 2010). Las PAs más abundantes en plantas son la espermidina (Spd), espermina (Spm) y su precursor la putrescina (Put). Diversos estudios han sugerido que las PAs también pueden actuar como quelantes de metales y ser buenas candidatas protegiendo las células frente al daño oxidativo producido por los metales (Groppa y Benavides, 2008).

3.5 Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios cuya estructura está compuesta por al menos un anillo aromático (C6) con uno o más grupos hidroxilos (-OH). Se sintetizan principalmente a partir del ácido cinámico que deriva a su vez de la fenilalanina (Figura 4). Los flavonoides se acumulan generalmente en células epidérmicas en órganos como flores, hojas, tallos, raíces, semillas y en sus formas glicosiladas pueden almacenarse en estructuras subcelulares como apoplastos y vacuolas (Scheidt y col., 2004).

La presencia de estrés tanto abiótico como biótico (por ejemplo luz U.V, radiaciones, bajas temperaturas, ataques de patógenos, entre otros) puede inducir a una acumulación de compuestos fenólicos en plantas. En particular los flavonoides y taninos se han asociado al sistema de defensa de las plantas (Michalak, 2006).

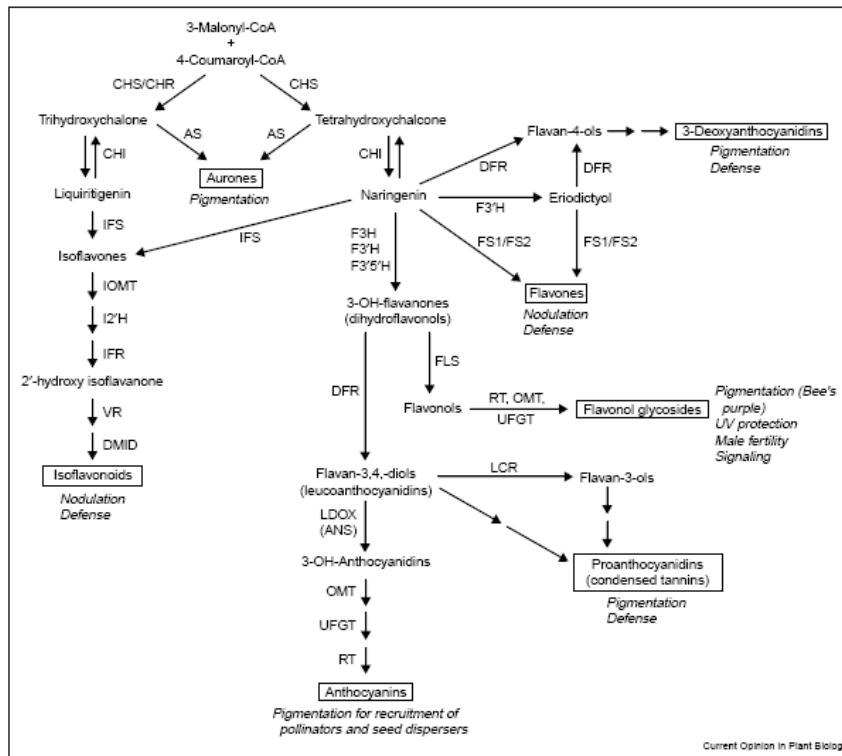


Figura 4. Esquema de la síntesis de los flavonoides en plantas.

La acción antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a que poseen grupos hidroxilos y carboxilos capaces de quelar metales, sobre todo Fe y Cu. En experimentos *in vitro* se ha demostrado la capacidad de los flavonoides de neutralizar especies reactivas de oxígeno como $\cdot O_2$, H_2O_2 , OH , 1O_2 , pudiéndoles donar electrones o átomos de hidrógeno (Hernández y col., 2009). Gracias a esta actividad antioxidante de los flavonoides, éstos actúan como protectores de la radiación, uniendo fitotoxinas y regulando la respuesta al estrés y controlando el transporte de auxinas (Winkel-Shirley, 2002).

3.6 Sistema antioxidante: Enzimas y componentes no enzimáticos antioxidantes

Los MP producen una fuerte alteración en el equilibrio redox de la célula produciendo ROS y aumentando el estrés oxidativo de ésta. Como las ROS son tóxicas pero también participan en eventos de señalización claves, las células necesitan diferentes mecanismos para regular su concentración intracelular. Los principales mecanismos de eliminadores de ROS son metaloproteínas que se encargan de convertir distintos tipo de moléculas ROS en otras menos tóxicas. Entre estas enzimas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Tabla 2) (Figura 5).

El balance entre las actividades SOD, APX (y/o CAT) es crucial en la determinación de los niveles de O_2^- y H_2O_2 y la prevención en la formación del tóxico $HO\cdot$ por la reacciones de Fenton o Haber-Weiss.

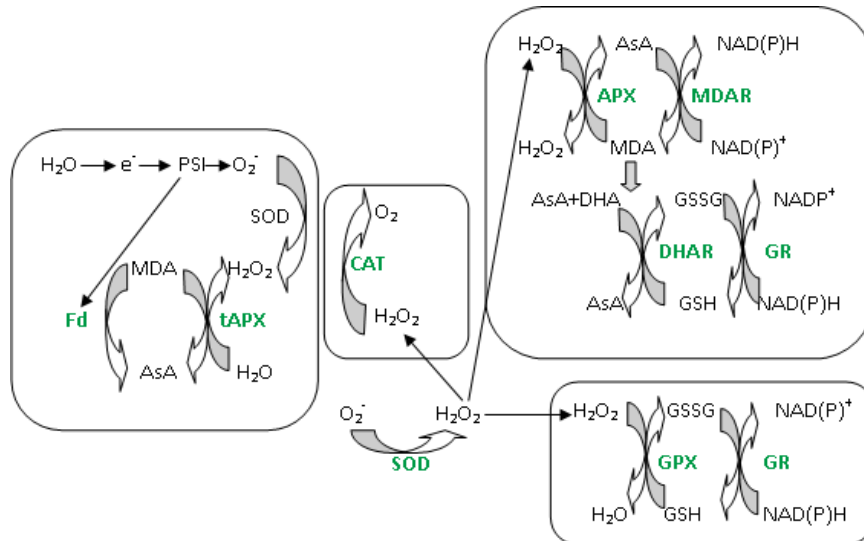


Figura 5. Esquema de eliminación de ROS por enzimas especializadas

Tabla 2. Mecanismo de acción de enzimas antioxidantes

Nombre	Cofactor	Reacción
Catalasa	Fe	$2 H_2O_2 \rightleftharpoons 2 H_2O + O_2$
Superóxido dismutasa (SOD)	Mn, Fe, Cu, Zn	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$
Ascorbato peroxidasa (APX)	Fe	$2 AsA + H_2O_2 + 2H^+ \rightleftharpoons 2 MDHA + 2 H_2O$
Xantina oxidoreductasa (XOR)	Mo, Fe, FAD	$Xantina + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons \text{ác. úrico} + NADH + H^+$
Peroxidada (PX)	Fe	$Donador + H_2O_2 \rightleftharpoons Donador oxidado + H_2O$

Además de estas enzimas antioxidantes, existen otros componentes no-enzimáticos muy relacionados con el sistema antioxidante de defensa, como son el ascorbato (AsA) y glutatión (GSH). El ascorbato es un compuesto de bajo peso molecular que debe su poder antioxidante a la capacidad de donar electrones en muchas reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Smirnof, 2007). Además de antioxidante, el papel del AsA en la planta está relacionado con el crecimiento, la diferenciación celular y el metabolismo (De Pinto y De Gara, 2004). El 90% del AsA se encuentra en el citoplasma pero también puede ser exportado al apoplasto donde se considera la primera línea de defensa frente al daño de oxidantes externos (De Pinto y col., 2006). Otra molécula antioxidante muy importante es el glutatión (GSH). El GSH es una molécula de bajo peso molecular compuesta por grupos tioles, implicada en un amplio rango de procesos de defensa frente a tóxicos. Además, el GSH tiene un importante papel en otros

4. EL ZINC Y LA VIDA

Este metal de color de blanco azulado, y de número atómico 30, es el 23 elemento más abundante en la corteza terrestre. Su aplicación principal actual es el galvanizado del acero que lo protege de la corrosión aunque también es usado en baterías, metalurgia de metales preciosos, aleaciones como el latón, alpaca, tombac, y en la fabricación de pinturas (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60-c6.pdf>).

El Zinc (Zn) es un elemento esencial para todos los organismos vivos. En plantas, este metal se encuentra como ión libre o asociado a complejos de gran variedad. También forma parte de proteínas y macromoléculas con funciones de cofactor de un número elevado de enzimas. Una deficiencia en Zn provoca disrupciones en las membranas debido a la inhibición de enzimas implicadas en la detoxificación de ROS (Brown y col., 1993). A pesar de todo esto, el Zn en altas concentraciones puede ser también tóxico y alterar el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Sagardoy y col., 2009).

5. COBRE: DE ESENCIAL A TÓXICO

El cobre (Cu), es un metal pesado de color rojizo y brillo metálico cuyo número atómico es 29 y que se encuentra en la naturaleza formando parte de muchos minerales, como la cuprita y la azurita. El Cu y su aleación con el estaño (el bronce) han sido empleados por el ser humano desde tiempos de prehistoria para la fabricación de todo tipo de utensilios y armas, alcanzando su máxima importancia en los últimos siglos con el desarrollo industrial y de la siderurgia. Actualmente, el Cu, forma parte del mundo que nos rodea ya que se utiliza para la fabricación desde monedas, cableado, pinturas, componentes de coches, trenes y barcos hasta en instrumentos musicales. Su valor cotiza incluso en bolsa. (<http://www.metalgestion.com/cobre/cobre-precios.html>).

A nivel biológico, el Cu es un microelemento fundamental para el funcionamiento de la célula. Está presente en muchas enzimas como ferroxidasas, citocromo c oxidasa, superóxido dismutasa, tirosinas, ceruloplasmina y monoamino oxidasa entre otras, además de estar implicado a bajas concentraciones en procesos biológicos como la formación de la pared celular (Norkus y col., 2002) y la fotosíntesis (Peñarrubia y col., 2010; Festa y Thiele, 2011). El Cu es un metal extremadamente reactivo y dañino para las células por lo que sus niveles están muy controlados. La media de contenido de Cu

en tejidos tisulares es de $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en peso seco (Baker y Senef, 1995), aunque el contenido crítico en un medio de cultivo debe ser de entre 10^{-6} y 10^{-9}M . Su deficiencia en plantas puede afectar al aparato respiratorio de éstas. Así, un estudio realizado en *A. thaliana* demostró que la deficiencia de Cu producía una estructura anómala de los cloroplastos y reducía la cantidad de clorofila (Puig, 2007). Por otra parte, concentraciones altas, pueden tener efectos devastadores para las células. Un exceso puede inhibir el crecimiento e interrumpir procesos importantes como la fotosíntesis y la respiración y una exposición crónica a altos niveles de Cu puede tener un efecto en la estructura de los cloroplastos y en el contenido de clorofila al igual que se producía en situaciones de deficiencia (Bernal y col., 2006). Además, el Cu es un metal redox muy potente que produce un estrés oxidativo muy fuerte por la formación de $(\text{OH}\cdot)$, $(\text{O}_2^{\cdot-})$ y H_2O_2 en las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton, desencadenando toda la cascada de reacciones relacionadas con la respuesta antioxidante (Sharma y col., 2012). Otros efectos de una concentración elevada de Cu son los daños producidos en DNA al alterar la conformación de éste (Bales y col., 2005).

Debido a los efectos tóxicos del Cu, la contaminación por este metal ha sido tema de regulación por muchos organismos. En 1974, la EPA publicó lo que se considera la ley de agua potable segura (“Safe drinking wáter”). En esta ley se pretendía determinar los niveles de contaminantes en aguas potables que no tuvieran efectos adversos para la salud. Para el Cu, el máximo nivel permitido se estableció en $1,3 \text{ mg/L}$ (ppm). Una exposición a niveles superiores puede causar desde problemas digestivos como náuseas hasta daños en el riñón o en el hígado (<http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/copper.cfm>).

El Cu es absorbido en sus dos formas iónicas Cu^+ (en suelos con poco oxígeno y mucha agua) y Cu^{2+} (en suelos aireados), presentando antagonismo con el Zn^{2+} a nivel de absorción, a través de los transportadores COPT. Los COPT son una familia de transportadores de metales con tres dominios transmembrana de los que se han identificado hasta 6 tipos diferentes. COPT1 es el transportador más estudiado y es responsable de la adquisición de Cu en la raíz aunque COPT2 también se localiza en la membrana plasmática del tejido de la raíz (Festa y Tiele, 2011). Una vez dentro de la célula, el transporte de Cu se realiza mayoritariamente por ATPasas tipo P conocidas como “heavy metal P-type ATPases” (HMAs). Los transportadores HMA1 a HMA4 están implicados en el transporte de cationes divalentes como Cu^{2+} pero también Zn^{2+} y

Cd^{2+} , mientras que de HMA5 a HMA8 transportan iones de Cu^+ . Otra familia encargada del transporte de Cu son las metalochaperonas. Ésas transportan el Cu desde el citoplasma hacia los lugares de utilización, insertándolas en los sitios activos de las proteínas Cu dependientes (Yruela, 2005). En plantas existen 3 tipos de Cu-chaperonas, CCH, COX17 y CCS.

6. ARSÉNICO. UN TÓXICO MUY EXPANDIDO

El arsénico (As) es un metaloide de color gris metálico o amarillo de número atómico 33. Muy ubicuo, está presente tanto en aguas subterráneas como superficiales y también en suelos. Se encuentra en diferentes formas químicas (metilado, unido a azúcares) y estados de oxidación (-3, 0, +3, +5) (Figura 7) siendo los más encontrados las formas aniónicas de arsenito (+3) y arseniato (+5). Conocido desde la antigüedad por su toxicidad, es el clásico veneno utilizado en la historia aunque en la actualidad tiene usos en la fabricación de semiconductores, de perdigones, o de vidrios y conservantes de la madera. También es usado como herbicida en la forma de sus compuestos metilados, el ácido monometilarsénico (MMAv) y dimetilarsénico (DMAv) (Hughes, 2002). En condiciones muy controladas y a muy baja concentración, el trióxido de arsénico (As_2O_3), también es utilizado con fines farmacológicos en enfermedades como la leucemia y el lupus (Bobé y Chelbi-Alix, 2008).

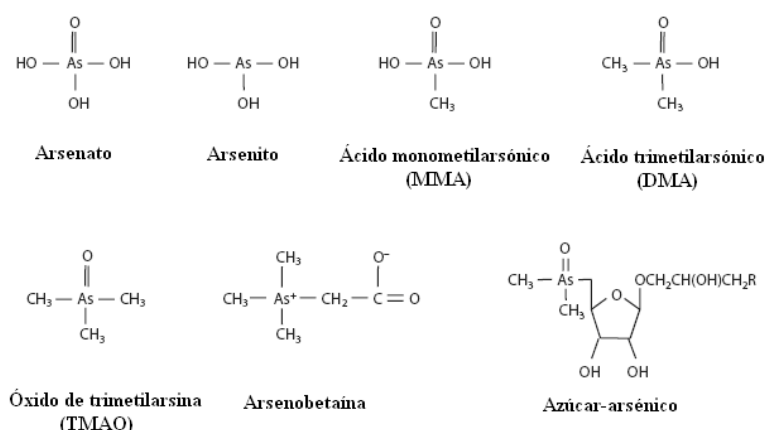


Figura 7. Compuestos de arsénico encontrados en suelos y plantas de (Zhao y col., 2010)

La presencia de arsénico en la rizosfera se debe a la propia composición de la corteza ya que forma parte de los 22 elementos conocidos que forman la corteza terrestre pero su concentración en el medio ambiente se acentúa por las distintas actividades humanas

como la minería y fundición, descarga de efluentes industriales, aplicación de pesticidas arsenicales y hasta riego con aguas contaminadas (Smith y col., 2003; Mukherjee y col., 2006). El As tiene la capacidad de ser fácilmente solubilizado en aguas dependiendo del pH, condiciones rédox, temperatura y composición del suelo. Estas concentraciones en agua rondan en condiciones normales entre 1 y 10 µg/L aunque se han encontrado algunas concentraciones elevadas de hasta 5000 µg/L (Nordstrom, 2002) (Tabla 3). Los efectos en la salud humana por la intoxicación de arsénico son variados: daños gastrointestinales, daños hepáticos, renales, cardiovasculares, dérmicos, respiratorios pero sobre todo es un potente carcinogénico de piel y riñón (WHO, 2011). E incluso se ha descrito una enfermedad, llamada hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE), que se produce por el envenenamiento continuo de éste y está caracterizada por trastornos cutáneos progresivos y/o lesiones cancerígenas viscerales (Astolfi y col., 1982). Por todos estos riesgos para la salud humana y su alta toxicidad, la cantidad tolerable de aparición de arsénico en agua potable es de 10 µg/L (EPA, USA) valor por encima del cual resulta perjudicial para la salud. Aunque en zonas del sudeste asiático como Bangladesh se estima que 25 millones de personas están expuestas a aguas contaminadas con más de 50 ppb de arsénico (Song y col., 2010). Pero no sólo el sudeste asiático está afectado por este problema, la contaminación por arsénico en aguas y suelos es un problema de importancia mundial que afecta en distinto grado a muchos países (Tabla 3).

Tabla 3. Contaminación global por arsénico según países

CONTAMINACIÓN GLOBAL POR ARSÉNICO EN AGUAS			
País/Región	Población expuesta	Concentración (µg/L)	Condiciones medioambientales
Bangladesh	30.000.000	< 1 a 2.5000	Naturales: Sedimentos en ríos
Bengal e India	6.000.000	<10 a 3.200	Naturales: Sedimentos en ríos
Vietnam	> 1.000.000	1 a 3.050	Naturales: Sedimentos en ríos
Tailandia	15.000	1 a >5.000	Antropogénico: Minería
Taiwán	100.000 a 200.000	10 a 1.820	Natural: Pizarras negras
Mongolia	100.000 a 600.000	<1 a 2.400	Natural: Ríos y lagos

			con sedimentos
Xinjiang, Shanxi	>500	40 a 750	Naturales: Sedimentos en ríos
Argentina	2.000.000	< 1 a 9.900	Natural: Rocas volcánicas, fuentes termales, alta alcalinidad
Chile	400.000	100 a 1.000	Natural y antropogénico: Rocas volcánicas, fuentes termales, minería
Bolivia	50.000	-----	Natural: Como Argentina y Chile
Brasil	----	0.4 a 350	Minería de oro
México	400.000	8 a 620	Natural y antropogénico: Sedimentos volcánicos y minería
Alemania	----	<10 a 150	Natural: Mineralizado en arena
Hungría, Rumanía	400.000	<2 a 176	Naturales: Sedimentos en ríos
España	>50.000	<1 a 100	Naturales: Sedimentos en ríos
Grecia	150.000	----	Natural y antropogénico: fuentes termales y minería
Gran Bretaña	----	< 1 a 80	Minería: Sudeste de Inglaterra
Ghana	< 100.000	< 1 a 175	Minería de oro
EEUU y Canadá	----	< 1 a > 100.000	Natural y antropogénico: minería, pesticidas, fuentes termales, sedimentos en lagos y ríos

El metabolismo del As tiene aún muchas lagunas y juega un papel fundamental en la comprensión de los mecanismos de su toxicidad. La distinta toxicidad del As está relacionada con su forma química y su estado de oxidación. En forma de arsenito es de 25 a 60 veces más tóxico que en forma de arseniato y se encuentra de forma más móvil

en el medio ambiente (Raven y col., 1998; Oremland y Stolz, 2003). El arseniato (V), es la principal especie de As en suelos aerobios y tiene una gran afinidad por óxidos/hidróxidos de Fe del suelo. Mientras que el arsenito (III) se encuentra en ambientes reducidos. Además, ambos son metilados por S-adenosilmetionina, (Thomas y col., 2007) a ácido monometilarsónico (MMA: $(\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2)$), a ácido dimetilarsónico (DMA: $(\text{CH}_3)_2\text{AsOOH}$) y en menor cantidad a óxido de trimetilarsina (TMAO: $(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$) (Figura 8). Los compuestos dimetilados de As y el TMA son volátiles y pasan al aire pero éstos son rápidamente oxidados durante el día por la radiación UV y vuelven a depositar en la tierra (Zhao y col., 2010).

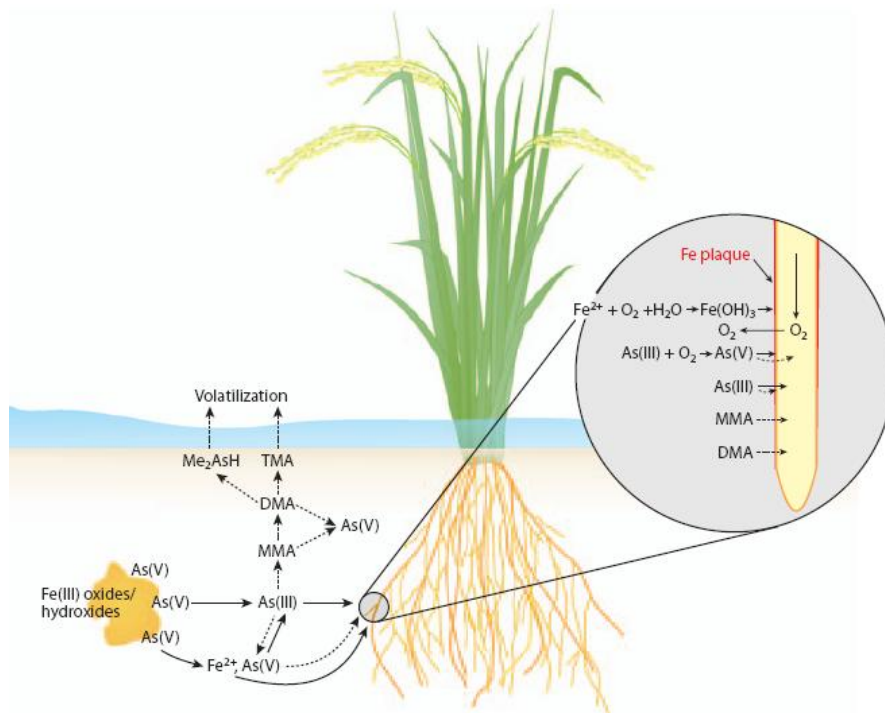


Figura 8. Movilización y transformación de As en el suelo y sus interacciones con la rizosfera. Tomado de (Zhao y col., 2010)

La entrada del As en la célula depende del estado de oxidación que éste tenga. En diversos estudios fisiológicos, se ha caracterizado al As (V) con gran similitud al PO_4 por lo que comparten la mayoría de transportadores en plantas aunque estos tienen más afinidad por el PO_4^{3-} que por el As (V) (Meharg y col., 1994). Los mecanismos de entrada del arseniato implican el cotransporte de éste y de protones, de al menos 2H^+ por cada molécula de arseniato (Zhao y col., 2008). Existen en plantas alrededor de 100 transportadores de PO_4 pertenecientes a la familia Pht1 expresados en su mayoría en las raíces (Zhao y col., 2009). Por otro lado, As (III) entra a través de canales de

aquaglicerilporinas, familias de proteínas tipo “nodulin 26-like intrinsec”, que transportan además varias moléculas como el ácido salicílico, ácido bórico, glicerol y urea entre otras (Gupta y col., 2011). Las especies metiladas de As MMA y DMA también entran dentro de la planta pero con menor eficiencia que las especies inorgánicas y mediante mecanismos aún no conocidos (Zhao y col., 2009).

Una vez dentro de la planta, el arsénico que entró en forma de As (V), puede ser de nuevo expulsado al medio de una forma similar a la que es expulsado el PO_4^{3-} cuando las plantas están expuestas a condiciones de altas concentraciones de éste (Mimura, 1999; Xy y col., 2007). Otra opción es que sea reducido a As (III) por la arseniato reductasa (ACR2) o por otras enzimas con ayuda del glutatión y que éste sea de nuevo expulsado al medio a través de canales (NIP) (Zhao y col., 2009). Mutaciones en plantas de arroz en el transportador Lsi2 (de clase NIP) tuvieron un efecto fuerte de transporte de arsenito al xilema y de acumulación en tallos (Mao y col., 2008). Pero no todo el arsénico puede ser expulsado, el que se retiene dentro de la célula reacciona con procesos metabólicos o compuestos de ésta provocando un daño enorme. Por ejemplo, el arseniato interrumpe el flujo de energía en la célula al reemplazar a los grupos fosfato en las moléculas de obtención de energía mientras que el arsenito reacciona con grupos sulfúricos y proteínas tisulares inhibiendo la función celular (Gupta y col., 2013). El primer paso de la detoxificación del As es la complejación con PCs. Existen una gran cantidad de genes o enzimas relacionadas con la síntesis, metabolismo y transporte de glutatión sobreexpresados cuando las plantas se someten a As (Norton y col., 2008; Lafuente y col., 2014), reflejando una gran demanda de GSH. Por otra parte, la translocación del As desde las raíces a los tallos, es ineficiente pero no inexistente, como se mostró en estudios en tomate expuestos a As inorgánico (Burló y col., 1999). Este hecho puede ser debido a que si el As entra en forma de As (V), éste es reducido rápidamente a As (III) en las raíces, siendo éste complejado por grupos tioles y llevado a vacuola. Es más, la translocación a parte aérea de los complejos As (III)-PC ó As (III)-GS aún no ha sido probada aunque este hecho es muy poco probable ya que estos complejos no son estables a $\text{pH} > 7,5$ y el interior del floema tiene pH alcalino (Zhao y col., 2010) (Figura 9).

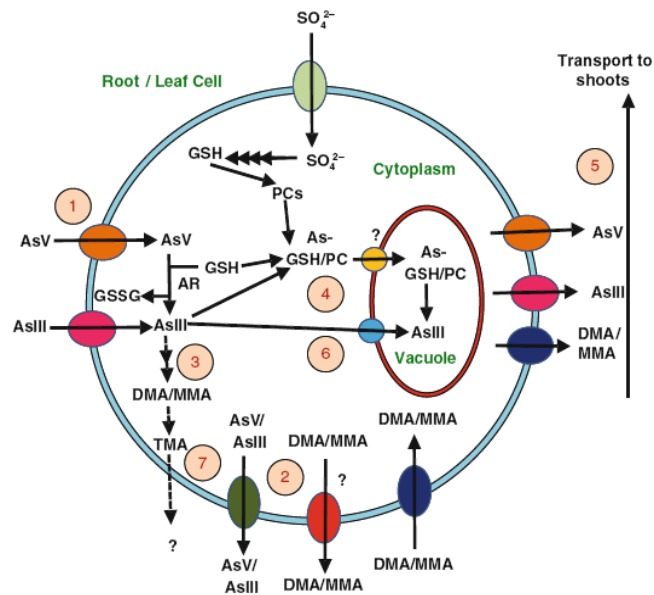


Figura 9. Mecanismos conocidos y comprobados de la detoxificación de As en plantas. Tomado de (Gupta y col., 2009). Los números indican una posible secuencia de mecanismos implicados en la detoxificación del As. 1. Entrada de As (V) y As (III) a través de transportadores de fosfato y aquaporinas. 2. El As que entra puede volver a salir fuera por gradiente de concentración entre el interior del citoplasma y el medio. 3. As se convierte en especies menos tóxicas. 4. Transporte a las vacuolas de As (III) ó As (III)-PC evitando su translocación a los tallos. 5. Bloqueo de la entrada de As (III) al xilema aunque existe una pequeña parte que lo consigue. 6. Secuestro en vacuolas. 7. En forma de TMA es volátil y puede salir a la atmósfera

7. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA LA ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS DE LA BIOSFERA

Una vez entendida la alta toxicidad y los problemas para la salud humana de los metales pesados, sus efectos en el medio ambiente se intentan paliar tratando de disminuir su concentración en la biosfera. Los métodos que existen actualmente para la eliminación de metales pesados de la biosfera son mayoritariamente dos: métodos físico-químicos y biorremediación.

Los métodos físico-químicos han sido hasta la época actual el único modo de lucha frente a la contaminación del medio ambiente. El objetivo de estos métodos era la atenuación natural, es decir, la desaparición de los contaminantes del medio ambiente. El gran problema de estos procesos es que son bastante lentos y con la contaminación que se produce hoy en día no son suficientes para contrarrestarlas.

Las diferentes técnicas para la eliminación de MP, tanto en aguas como en suelos, son mecánicas de ingeniería civil que consisten en quitar el contaminante mediante remoción de suelos o arenas contaminadas y separación y filtración de sólidos. Primero,

se retira la capa superficial contaminante para luego hacer un lavado al suelo o la separación física o química de contaminantes (“soil washing”). Sin embargo, estos tratamientos muchas veces consisten en trasladar la contaminación de un medio a otro. También se suelen añadir productos químicos correctores de pH, surfactantes, agentes quelantes y la reducción/oxidación química que convierte al contaminante a un estado más estable y móvil (Vangronsveld y Cunningham, 1998).

Estas opciones en remediación sufren gran crítica debido a su elevado coste (Glass, 1999) y el daño que suponen al medio ambiente. Además, no siempre son eficaces ya que pueden existir zonas de difícil acceso, grandes áreas con cantidades importantes de metales ó la presencia de rocas en los terrenos que disminuyen la eficacia de estas técnicas o incluso hace imposible su aplicación. Para estos y otros casos, se han planteado la utilización de métodos alternativos basados en la utilización de microorganismos y plantas con capacidad de tolerar y acumular contaminantes del suelo.

8. BIORREMEDIACIÓN. UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA LA CONTAMINACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE

La biorremediación consiste en la utilización de organismos vivos para la remediación ambiental. Los más usados son los microorganismos (tanto bacterias como algas y hongos), las plantas (fitorremediación) y los nemátodos (vermirremediación) (Gupta y col., 2009). Esta tecnología se presenta como amigable desde el punto de vista medioambiental, de bajo coste y gran aceptación pública (Pilon-Smits, 2005). Además, con su desarrollo y mejoramiento gracias a la investigación que actualmente muchos grupos en el mundo llevan a cabo, se podrían aplicar en los procesos industriales que son contaminantes reduciendo costes o sustituyendo algunas de sus etapas, especialmente si se pudieran aplicar estas técnicas *in situ* a pie de fábrica (Gargouri y col., 2011).

Debido a su simplicidad genómica y a su facilidad de cultivo, los microorganismos han sido objeto de un vasto estudio para su uso en biorremediación. Las bacterias, por ejemplo, tienen alta capacidad para la degradación de compuestos de múltiple naturaleza y esta degradación puede llegar hasta diferentes niveles. Si la sustancia se degrada completamente se habla de mineralización, proceso ideal que no siempre ocurre. Algunas sustancias no son degradadas sino transformadas en otras

(biotransformación). La biotransformación puede ser peligrosa, ya que la nueva sustancia formada puede ser tan nociva o más que la de partida. Aunque, hay sustancias que no son degradadas y se las denomina recalcitrantes. Además, las bacterias tienen un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos, en el desarrollo sostenible de la biosfera y la gran diversidad de sus metabolismos abre una amplia gama desde el punto de vista de la elección del mejor microorganismo para la detoxificación o degradación de un determinado compuesto. Por todo esto, las bacterias se han utilizado con éxito en la descontaminación tanto de compuestos orgánicos (Díaz, 2004) como de MP (Valls y de Lorenzo, 2002; Silver y Phung, 2005). Aunque también se ha investigado sobre el uso de hongos (micorremediación). Uno de los principales papeles de los hongos en los ecosistemas es el de descomposición, ya que segregan enzimas extracelulares y ácidos que degradan la lignina y la celulosa, compuestos formados por largas cadenas de carbono (Kumar *et al.*, 2008). Estas estructuras químicas son muy similares a las de muchos contaminantes actuales.

Aunque también se han usado organismos más complejos para paliar la contaminación como las plantas. Las investigaciones en fitorremediación (uso de plantas para eliminar o inactivar contaminantes de suelos y de aguas) han avanzado mucho en los últimos años (Sharma, 2011). En el siguiente apartado se detallará mucho más a fondo esta técnica.

9. FITORREMEDIACIÓN COMO FUTURO EN BIORREMEDIACIÓN

El término “fitorremediación” es la combinación de dos palabras: *phyto*, del griego que significa planta y *remedium*, del latín, que significa corregir o eliminar un mal. La fitorremediación es una tecnología reciente con numerosos estudios en las pasadas dos décadas. Ya el concepto de fitorremediación (como fitoextracción) fue sugerido por Chaney en 1983.

La fitorremediación posee grandes ventajas en biorremediación por su posibilidad de aplicación *in situ*, uso de energía solar, fácil aplicación, uso para un amplio rango de contaminantes, conocimiento de las bases agrícolas, etc. Y además aporta valor añadido por hacer a los lugares estéticamente más atractivos por lo que la aceptación social aumenta considerablemente. Desde el punto de vista económico, el propósito de la recuperación de suelos y aguas contaminados tiene puntos importantes como la fitoextracción de metales de alto valor económico como Ni, Ti, Cu, Au y las mejoras

producidas en la calidad del suelo que aumentan de valor en el mercado (Vangronsveld y col., 2009).

Los mecanismos usados por las plantas son muy variados (Figura 10) (Pilon-Smits, 2005):

- a) Fitoextracción: Los agentes contaminantes pueden ser absorbidos y almacenados. En este caso, la translocación del metal a las hojas es un proceso esencial que debe producirse cuando la biomasa de la raíz no es suficientemente abundante (Tangahu y col., 2011).
- b) Fitofiltración: La eliminación de los contaminantes se produce por absorción o adsorción, quedando limitado el movimiento de éstos. Estos procesos engloban la rizofiltración (uso de raíces de plantas), blastofiltración (uso de plántulas) o caulofiltración (uso de tallos extirpados) (Mesjasz-Przybylowicz y col., 2004)
- c) Fitoestabilización: Los tóxicos son quelados por compuestos orgánicos e inmovilizados en el suelo. Las plantas pueden inmovilizar metales pesados en suelos por la captura de la raíz, precipitación, complejación del metal o reducción de su estado de oxidación en la rizosfera (Okiemen, 2011).
- d) Fitovolatilización: Los compuestos son tomados del suelo y convertidos en otros volátiles que son evaporados a la atmósfera. Esta técnica puede usarse con algunos metales pesados como Hg o Se (Padmavathiamma y Li. 2007).
- e) Fitodegradación: Las enzimas de la planta, tales como, dehalogenasas y oxigenasas, degradan los contaminantes. Este proceso es independiente de los microorganismos rizosféricos (Vishnoi y Srivastava, 2008). Las plantas pueden incorporar compuestos orgánicos tóxicos y detoxificarlos mediante sus actividades metabólicas.

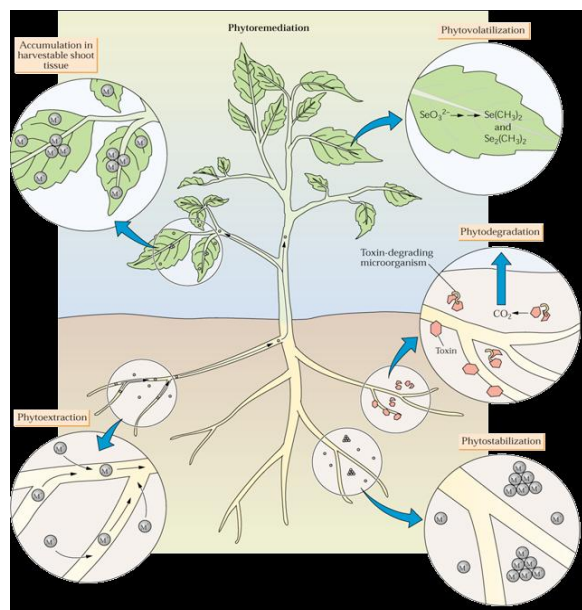


Figura 10. Mecanismos de detoxificación usados por las plantas

Existen más de 500 especies de plantas capaces de hiperacumular metales pesados (Tabla 4), por eso las plantas hiperacumuladoras son modelos en estudios de acumulación y tolerancia en fitorremediación (Ali y col., 2013). Sin embargo, el valor ecológico y biológico de éstas no es aún muy claro. Las investigaciones recientes se centran en estudiar técnicas moleculares que ayuden a mejorar el rendimiento de tecnologías en fitorremediación (Sharma, 2011). Estas técnicas moleculares ayudan a comprender la regulación genética y los sistemas de adaptación de estas plantas lo que da una visión general de los genes más importantes en relación con los metales.

Tabla 4. Plantas hiperacumuladoras de metales

Planta	Metal	Acumulación (mg/kg)	Referencia
<i>Alyssum bertolonii</i>	Ni	10.900	Li y col., (2003)
<i>Alyssum caricum</i>	Ni	12.500	Li y col., (2003)
<i>Alyssum heldreichii</i>	Ni	11.800	Bani y col., (2010)
<i>Alyssum murale</i>	Ni	15.000	Li y col., (2003)
<i>Alyssum pterocarpum</i>	Ni	135.000	Li y col., (2003)
<i>Berkheya coddii</i>	Ni	18.000	Mesjasz-Przybylowicz y col., 2004
<i>Azolla pinnata</i>	Cd	740	Rai y col., (2008)
<i>Corrigiola telephiiifolia</i>	As	2.110	(García-Salgado y col., 2012)
<i>Eleocharis acicularis</i>	Cu	20.200	Sakakibara y col., 2011
<i>Euphorbia cheiradenia</i>	Pb	1.138	Chehregani y Malayeri, (2007)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd	263	Lombi y col. (2001)
<i>Schima superba</i>	Mn	62.412,3	Yang y col., 2008
<i>Pteris cretica</i>	As	Aprox. 1.800	Srivastava y col. (2006)
<i>Pteris quadriaurita</i>	As	Aprox. 2.900	Srivastava y col. (2006)

Con el avance en el conocimiento en los genomas y la biotecnología, se han venido utilizando raíces transgénicas como herramienta en biorremediación y producción de compuestos de alto valor añadido (Gleba y col., 1999, Boominathan y Doran, 2002; Guillón y col., 2006). Estas raíces son generadas tras la infección con *Agrobacterium rhizogenes* y presentan un crecimiento neoplásico *in vitro* en medios suplementados con fuente de carbono. La ingeniería genética permite transferir, durante el proceso de infección con *A. rhizogenes*, determinados genes que pueden incrementar la capacidad de biorremediación de este sistema (de Lorenzo, 2008). Los genes candidatos para la transgénesis pueden tener diversa naturaleza aunque todos deben tener la característica de ser potencialmente mejoradores de la eficacia y eficiencia de la biorremediación (Tabla 5) (Kramer y Chardonnais, 2001). En esta lista podemos encontrar desde genes bacterianos hasta genes pertenecientes a plantas.

Tabla 5. Genes introducidos en plantas y los efectos de su expresión para la acumulación, tolerancia y volatilización de MP. [Referencias del texto]: A Acumulación en la raíz; GSH: glutatión; MT: metalotioneína; T: tolerancia; V: volatilización (Kramer y Chardonnais, 2001).

Gen	Producto	Fuente	Organismo	Máximo efecto observado	Medio raíz
<i>merA</i>	Hg (II) reductasa	Bacteria Gram-Negativa	<i>Liriodendron tulipifera</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	T 50 μM HgCl_2 ; 500 mg HgCl_2 kg^{-1} V Tasa de volatilización de Hg 5 veces incrementada	Agar, suelo Agar
<i>merA</i> <i>merB</i>	Hg (II) reductasa Liase organomercurial	Bacteria Gram-Negativa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T 10 μM CH_3HgCl (>40 veces) Más de 59 μg $\text{Hg}(0)$ mg^{-1} en biomasa fresca min^{-1}	Agar Solución
<i>APS1</i>	ATP sulfurilasa	<i>A. thaliana</i>	<i>Brassica juncea</i>	A Incremento 2 veces concentración Se	Hidropónico
<i>MT-1</i>	MT	Ratón	<i>N. tabacum</i>	T 200 μM CdCl_2 (20 veces)	Agar
<i>CUP1</i>	MT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>B. oleracea</i>	T 400 μM CdCl_2 (aprox. 16-veces)	Hidropónico
<i>gsh2</i>	GSH sintasa	<i>Escherichia coli</i>	<i>B. juncea</i>	A Concentraciones 125% Cd	Hidropónico
<i>gsh1</i>	γ -Glu-Cys sintasa	<i>E. coli</i>	<i>B. juncea</i>	A Concentraciones 190% Cd	Hidropónico
<i>NiCBP4</i>	Canal cationes	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	T 250 μM NiCl_2 (2,5 veces), Sensible Pb A Concentraciones Pb 200%	Hidropónico
<i>ZAT1</i>	Transportador Zn	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	T Ligeramente aumento	Hidropónico

Sin embargo, no existen muchos trabajos donde se aborde la obtención de raíces transgénicas con resistencia incrementada a ningún metal pesado o metaloide aunque existen algunos artículos donde se han obtenido plantas transgénicas con resistencia incrementada a As (Dhanker y col., 2002; Heaton, 2005).

Las plantas candidatas para posibles estudios de fitorremediación deben tener idealmente las siguientes características (Sakakibara y col., 2011 y Shabani y Sayadi, 2012):

- a) Alta tasa de crecimiento
- b) Producción de gran cantidad de biomasa
- c) Sistema de raíz ampliamente distribuible y ramificada
- d) La mayor acumulación posible de metal
- e) Tolerancia a los efectos tóxicos de los metales pesados
- f) Buena adaptación al medio ambiente y a distintas condiciones climáticas
- g) Resistencia a patógenos y plagas
- h) Fácil cultivo y recolección
- i) Repulsiva a herbívoros para evitar la entrada del metal en la cadena alimenticia

9.1 Cuantificación de la eficiencia en la fitoextracción

Existen diferentes parámetros que pueden calcularse para conocer la eficiencia en la fitoextracción. La viabilidad y las pruebas de la capacidad de biorremediación de metales por las plantas en un suelo o agua están aún limitados debido a que la mayoría de las concentraciones experimentales se realizan en un rango específico y no proporcionan mucho conocimiento de cultivos a gran escala. Por eso, en estudios de este tipo deberían suplementarse con modelos predictivos de la relación entre la plantas y la capacidad de captación de metales (Liang y col., 2009).

Uno de los primeros parámetros que deben ser cuantificados es el factor de bioconcentración. El factor de bioconcentración indica la eficiencia de las plantas en acumular metal en un tejido en relación con el medio que le rodea (Zhuang y col., 2007). La ecuación que lo calcula es la siguiente:

- Factor de Bioconcentración (FBC)= Concentración en el tejido / Concentración en el suelo

Este parámetro también puede representarse en porcentajes y nombrándolo entonces como Factor de Acumulación (Wilson y Pyatt., 2007).

- Factor de acumulación (FA)= (Concentración tejido /Concentración suelo) X 100

Otro parámetro importante es el factor de translocación. Este parámetro indica la eficiencia de la planta en translocar el metal acumulado desde la raíz hasta las hojas. La ecuación que lo calcula es la propuesta en Padmavathiamma y Li., (2007).

- Factor de translocación (FT)= Concentración en tallos/ Concentración en raíz

Tanto el FBC como FT son importantes a la hora de definir hiperacumuladores y de medir la capacidad de fitoextracción de metales pesados. Sin embargo, éstos parámetros deben ser comparados con la capacidad de crecimiento de las plantas en suelos homogenizados o cultivos hidropónicos ya que suelos con grandes concentraciones de metales pueden dar FBC menor de 1, o plantas crecidas en suelos con deficiencia en metales esenciales pueden tener una alta capacidad de secuestrar metales y por tanto un muy alto FBC.

9.2 Limitaciones en la fitorremediación

Aunque las técnicas de fitorremediación tienen un futuro prometedor, existen algunas limitaciones para las aplicaciones (Mukhopadhyay y Maiti., 2010; Naees y col., 2011; Ramamurthy y Memarian, 2012).

- a) Largos periodos de tiempo para lograr la detoxificación
- b) Limitaciones en la extracción por la poca biomasa o el lento crecimiento de las plantas
- c) Dificultad en la movilización de metales unidos a compuestos del suelo:
Limitada biodisponibilidad
- d) Limitada a sitios con moderada contaminación ya que el crecimiento de las plantas no es sostenible con grandes cantidades de contaminantes
- e) Riesgo de entrada de los metales en la cadena alimentaria

9.3 El futuro en la fitorremediación

Debido a que ésta es una técnica novel, lo mejor se espera que llegue en un futuro próximo. En la actualidad, se necesitan mayores experimentos a largo plazo en ensayos de campo donde se tengan en cuenta las variaciones de temperatura, nutrientes, precipitaciones de lluvia, patógenos de planta, presencia de herbívoros, distribución del

contaminante, tipo y pH del suelo, su estructura, etc. (Vangronsveld y col., 2009). Todos estos estudios son necesarios para hacer real la comercialización de esta tecnología. Si además, aplicamos la ayuda de otros organismos que promuevan el crecimiento y desarrollo de las plantas y además protejan a las plantas de los efectos adversos de los metales, la mejora en la eficiencia sería considerable (Mleczek y col., 2013).

Existen también muchas investigaciones en marcha sobre la identificación de genes diana específicos para la hiperacumulación de metales pesados en plantas especialmente considerados para ser modificados o introducidos en otras especies (Barabasz y col., 2010). Las plantas transgénicas generadas de estas tecnologías, que tendrían características deseadas en fitorremediación, se podrían combinar por técnicas tradicionales con otras especies o incluso usar métodos de hibridación como la fusión de protoplastos (Pollard y col., 2002). No obstante, estas nuevas técnicas deben ser estudiadas cuidadosamente e inteligentemente para no producir daños mayores en la biosfera. Pero a pesar de las lagunas que aún existen en estas técnicas, la fitorremediación se prevee que sea una de las técnicas verdes con mayor potencial en el futuro.

SUMMARY



1. ABSTRACT

Due to the high levels of contamination in the world, it is necessary develop successful strategies to clean the environment avoiding expensive physicochemical methods. In this context, bioremediation provides a good cleanup strategy. This research analyzes three different biotechnological tools designed for bioremediation of metal and metalloids in soils or waters.

2. METHODOLOGY

These three tools involve, from whole transgenic plants (*A. thaliana*) to composite plants of *M. truncatula* and hairy roots of *N. tabacum*. The following approaches have been undertaken: a) Generation of transgenic *Arabidopsis thaliana* by overexpressing the metallothionein gene *mt4a* in vegetative tissues, in order to increase metal tolerance or accumulation; b) Generation of composite *Medicago truncatula* plants by heterologous expression of *mt4a* from *A. thaliana* in roots, in order to improve tolerance towards metals and nodulation, and enhance metal phytostabilization in soils; c) Generation of transgenic tobacco hairy roots expressing the bacterial genes *copC* (encoding a copper-binding protein) or *arsB* (coding an arsenite efflux pump) in order to accumulate Cu or As, respectively, from polluted waters. In the last case, subcellular targeting to the vacuole was also attempted in order to further increase accumulation or to decrease stress generated by metals. These plants were exposed to different heavy metals, including Zn, Cu and As. Several studies were made: determination of growth and physiological parameters, accumulation profiles, bioconcentration factors, antioxidants assays and analysis of transcriptomic and metabolomic profiles.

3. RESULTS

The results suggest that these plants, expressing different genes, showed improved tolerance towards heavy metal, as deduced from growth and physiological parameters. Concerning metal accumulation, the results were heterogeneous: a) *A. thaliana* showed a mild increment in Cu accumulation in roots, without increases in Zn content. b) Composite plants of *M. truncatula* exhibited enhanced tolerance towards Cu, lower oxidative stress and better nodulation, together with increased Cu accumulation in roots, suggesting an application in Cu phytostabilization in soils. c) Hairy roots from *N. tabacum* expressing the *copC* gene achieved maximum accumulation levels of Cu 45,000 $\mu\text{g. g}^{-1}$ without displaying toxicity symptoms, which, to our knowledge, was one of the highest Cu concentrations in a biological sample. These results point to an interesting use of this bio-tool in rhizofiltration. d) On the contrary, hairy roots from *N. tabacum* expressing the *arsB* gene showed moderate increases in As accumulation, probably due to a limitation in the entrance of this metalloid through the plasma membrane. Unlocking metal uptake by strategies such as phosphate deprivation or desiccation considerably enhanced metal accumulation, to maximum levels of 10,000 $\mu\text{g. g}^{-1}$ when the ArsB pump was targeted to the tonoplast. However, the oxidative stress and particularly lipid peroxidation leading to membrane damage, was not alleviated. Transcriptomic and metabolomic analyses suggest that in transgenic roots expressing ArsB in the plasma membrane, genes involved in the electron transport chain are highly overexpressed, whereas in those expressing AsrB in the tonoplast, the glutathione/ phytochelatins synthesis pathway was particularly induced.

4. DISCUSSION

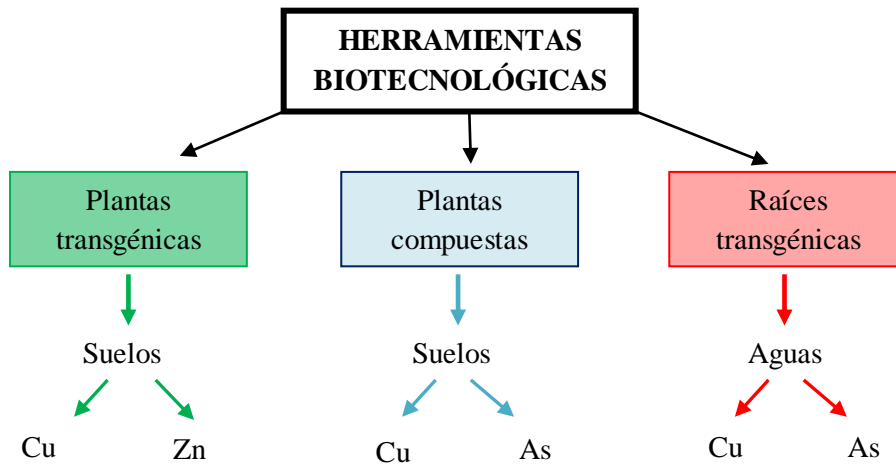
In this work, several bio-tools based on transgenic expression of different genes were generated. Genetic engineering has proved to improve the

phytoremediation potential of whole plants or hairy roots by increasing metal tolerance and/or accumulation. Transcriptomic and metabolomic analyses led to the knowledge of overexpressed genes and compounds after the exposition of hairy roots to As, being able to find targets for news studies.

OBJETIVOS

En este trabajo, se propone el diseño de una batería de herramientas biotecnológicas destinadas a aumentar la eficiencia y la eficacia de diferentes tipo de plantas que expresen genes heterológamente y así comprobar y estudiar sus posibles aplicaciones y su desarrollo en el futuro en casos de escalamiento a estudios en campo. Entre estas estrategias se encuentran:

1. Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *mt4a*
2. Plantas compuestas de *Medicago truncatula* que expresan el gen *mt4a* de *A. thaliana* y sobreexpresan los genes *ERN* y *ENOD12*
3. Raíces transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresan el gen *copC* de *Pseudomonas fluorescens* en el citoplasma y en la vacuola y el gen *arsB* de *Ensifer medicae* en la membrana externa o en el tonoplasto



**HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 1:
PLANTAS TRANSGÉNICAS DE
ARABIDOPSIS THALIANA QUE EXPRESAN
LA METALOTIONEÍNA ESPECÍFICA
DE SEMILLAS MT4a**

INTRODUCCIÓN

Arabidopsis thaliana es la planta modelo por excelencia en investigación de biología de plantas (Koornneef y Meinke, 2010). Perteneciente a la familia de las [*Brassicaceae*](#) es nativa de Europa, Asia y del noroeste de África. El uso de esta planta herbácea como modelo de las plantas en el laboratorio se consolidó en los años 80 (Meyerowitz, 1989). Las características que la han hecho elegida, son un ciclo de vida rápido, producción de numerosa progenie, requiere poco espacio y es fácil de cultivar en invernaderos o cámaras de cultivo. También ha influido el tamaño relativamente pequeño de su genoma que fue secuenciado en su totalidad en el año 2000 por la *Arabidopsis Genome Initiative*. Las 120-megabases del genoma de *Arabidopsis* están organizados en 5 cromosomas que contienen aproximadamente 20.000 genes (Meinke y col., 1998). Además, su genoma contiene baja proporción de secuencias repetidas de ADN y puede ser manipulado mediante ingeniería genética con mayor facilidad y rapidez que otras plantas (Bechtold et al., 1993). Por todo esto, la investigación en *Arabidopsis* abarca todo tipo de campos y procesos biológicos desde la germinación, la floración, o la respuesta a diferentes tipos de estrés.

En este capítulo, se ha utilizado esta planta modelo para diseñar una primera herramienta biotecnológica enfocada a la fitoestabilización de metales pesados en suelos.

Debido a su capacidad de quelar metales, los genes de las MTs son elegidos para manipulación genética con fines en fitorremediación de metales pesados (Kramer y Chardonnais, 2000; Pilon-Smits y Pilon, 2002). Se han realizado varios ensayos para incrementar los niveles de diferentes MTs, en *E. coli*, levaduras y plantas y en algunos casos se ha descrito un aumento de la tolerancia a Cu y a otros metales (Tommey y col., 1991; Evans y col., 1992; Eapen y D'Souza, 2005). Especialmente en plantas, se han expresado diversas metalotioneínas para potenciar la tolerancia a Cd, su acumulación o distribución (Mejaré y Bülow., 2001). Las primeras aproximaciones sobre este tipo de experimentos aparecieron en 1989, donde la MT-II procedente de humanos se clonó en tabaco y colza, aumentando la tolerancia de estas plantas a concentraciones de Cd de 100 μ M (Misra y Gedamu, 1989) (Tabla 1). Otras MTs de ratón, humanos e incluso de guisante también han servido para transformar desde tabaco, a *Arabidopsis*, e incluso

procariotas como *E. coli*, aumentando la tolerancia e incluso en ciertas ocasiones la acumulación de metales como Cd, Cu y Zn (Tabla 1).

Tabla 1. Expresión de diferentes MTs de distintos organismos en plantas para la mejora en acumulación y tolerancia a metales pesados.

Expresión de diferentes MTs en plantas transgénicas			
Tipo MTs	Planta	Efecto	Referencia
MT-II Humano	Tabaco, colza	Tolerancia Cd	Misra y Gemadu., 1989
MT-I Ratón	Tabaco	Acumulación Cd	Maiti y col., 1989
MTa Guisante	<i>Arabidopsis</i>	Acumulación Cu	Evans y col., 1992
MT-II Hámster	<i>E.coli</i>	Acumulación Cd	Hattori y col., 1994
MT-Ia Hígado humano	Tabaco	Tolerancia a Cd	Pan y col., 1994
MT-I Ratón	Tabaco	Tolerancia Cd	Pan y col., 1994
MT-I Humano	Tabaco	Acumulación Cu	Borne y col., 1998
Nicotiana glutinosa MT-like	Tabaco	Tolerancia a Cd	Shu y col., 1998
MT-levaduras (CUP1)	Tabaco	Acumulación Cu	Thomas y col., 2003
MT-I Guisante	Álamo blanco	Acumulación y tolerancia a Cu y Zn	Turchi y col., 2012

Por ello, en este capítulo se ha sobre expresado una metalotioneína (MT) en plantas de *A. thaliana* con efecto de incrementar su tolerancia a metales pesados o su capacidad de acumular estos elementos tóxicos. En particular, se ha sobreexpresado la MT específica de semillas de *A. thaliana*, codificada por el gen *mt4a*. Esta MT, intervine, probablemente, en la embriogénesis y en la preparación de las semillas para los periodos secos y también proporciona a la planta un mecanismo de almacenamiento de Zn y otros metales que son requeridos para el crecimiento y la germinación (Kawashima y col., 1992; White y Rivin, 1995). Las MTs de las plantas están clasificadas en 4 tipos según los residuos de cisteína que contienen (MT1a, MT2a, MT2b, MT3, MT4a y MT4b). Las MTs tipo 4 (MT4a y MT4b), confieren una gran tolerancia y acumulación frente a Zn con respecto a las demás MTs, siendo MT4a la que mayor acumulación proporciona.

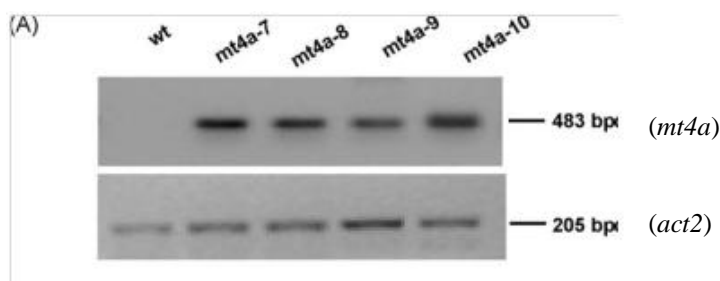
Además, esta MT también aumenta la tolerancia de Co, aunque es inefectiva frente a Cd (Guao y col., 2008) por lo que es interesante conocer el efecto que produce su sobreexpresión frente a Cu.

RESULTADOS

1. Expresión transgénica de *mt4a* en *Arabidopsis thaliana*

El gen *mt4a* de *A. thaliana* se expresa de forma específica en las semillas (Guo y col., 2008) y no en otros tejidos, por lo que se pudo comprobar el éxito de la transformación midiendo la expresión del gen (mediante técnica de RT-PCR semicuantitativa) en los tallos de las plantas de 7 días de crecimiento. Para normalizar los resultados de las diferentes muestras, se usó el gen *ACT2*, que codifica a la actina, como control. Las plantas transgénicas mostraron diferentes niveles de expresión de *mt4a* (Figura 1A). Como se esperaba, no se encontró expresión en plantas control. Las líneas transgénicas *mt4a-7* y *mt4a-10* mostraron los mayores niveles de expresión (de 1 y 0,98 respectivamente) (Figura 1B) y fueron las elegidas para la continuación de los estudios. Las otras dos líneas, *mt4a-8* y *mt4a-10*, alcanzaron menor nivel de expresión de 0,91 y 0,82 respectivamente.

Antes de estudiar la tolerancia en plantas maduras, se comprobó la expresión del gen *mt4a* en raíces y tallos en las líneas *mt4a-7* y *mt4a-10* con 30 días de crecimiento. Una vez más, no se encontró expresión alguna en raíces y tallos de plantas silvestres. Se observaron altos niveles de expresión en ambos tejidos (Figura 1C). No se observaron diferencias de expresión entre raíces y parte aérea, así como tampoco entre ambas líneas transgénicas.



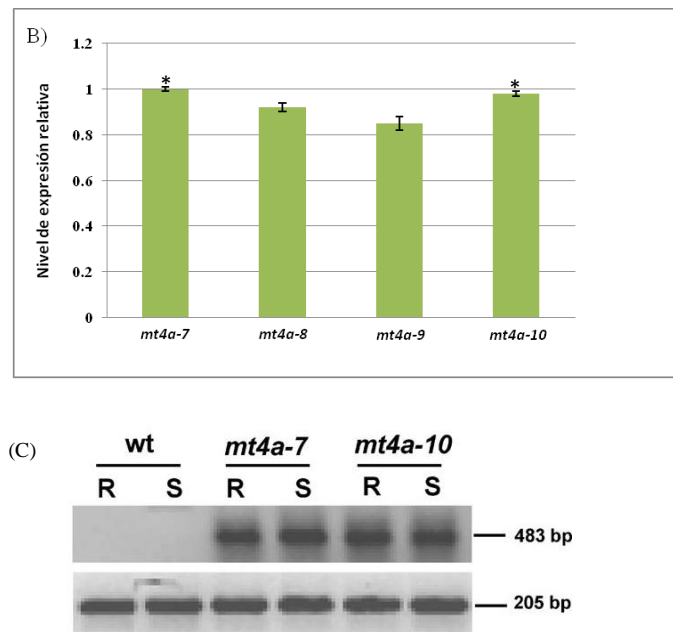


Figura 1. Análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen *mt4a* en líneas transgénicas de *A. thaliana*. (A) Expresión de *mt4a* en plantas control (wt) de 7 días de edad. No se detecta transcripción de *mt4a* en plantas control. Como control, se utilizó la expresión mediante RT-PCR del gen de la *act2*. (B) Niveles de expresión las diferentes líneas transgénicas que expresan *mt4a* en tejidos vegetales. Los mayores niveles de expresión se encontraron en las líneas transgénicas *mt4a-7* y *mt4a-10*. (C) Análisis por RT-PCR de la expresión del gen *mt4a* en raíces (R) y tallos (S) de plantas transgénicas y silvestres. Se encontraron niveles de expresión similares en raíces y tallos en ambas líneas transgénicas. No se encontró expresión del gen *mt4a* en raíces o tallos de plantas silvestres

2. Influencia de la sobreexpresión de *mt4a* en la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de Cu o Zn

Con el objetivo de analizar si la sobreexpresión del gen específico de semillas *mt4a* afecta a la germinación de las semillas de *A. thaliana* en presencia de Cu o Zn, las semillas silvestres y transgénicas se germinaron en presencia de elevados niveles de Cu o Zn. En el rango de concentraciones entre 25 y 100 mM de Cu, no se afectó significativamente la germinación. A concentraciones mayores de 150 mM, se observó un efecto positivo de la expresión de *mt4a* en la germinación, especialmente en la línea *mt4a-10*. La germinación se incrementó en este caso alrededor de un 15%. En relación con el Zn, no se observaron efectos en la germinación de semillas a concentraciones entre 0-200 mM (Figura 2).

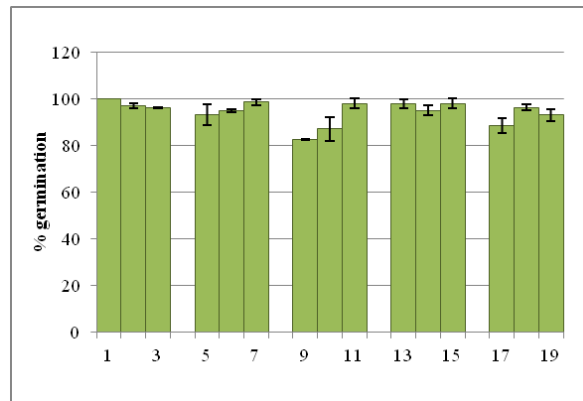


Figura 2. Porcentaje de germinación de semillas de *A. thaliana* frente a concentraciones de 0-150 mM de Cu y de 0-200 mM de Zn

3. Influencia de la expresión de *mt4a* en tejidos vegetales sobre la tolerancia a Cu y Zn de plantas de *A. thaliana*

Para determinar si la expresión de *mt4a* en tejidos vegetativos tiene influencia en la tolerancia a Cu y Zn en plántulas, se germinaron semillas transgénicas de *mt4a-7* y *mt4a-10* en medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) durante 3 días y se transfirieron y mantuvieron durante 11 días en medio MS fresco o en medio MS suplementado con CuSO_4 100 μM ó con ZnCl_2 200 μM . Al analizar concentraciones más altas de Cu (150 μM), no se encontraron diferencias significativas entre las plantas silvestres y las transgénicas, ya que esa concentración es letal para las semillas crecidas en placas de agar. El crecimiento se midió pasados 4 días (plantas de 7 días). En presencia de Cu, las raíces de las plantas transgénicas de las líneas *mt4a-7* y *mt4a-10* crecieron el doble de longitud que las raíces de las plantas control (Figura 3A y 3B). A diferencia del Cu, una concentración de 200 μM de ZnCl_2 redujo sólo un 10% la longitud de la raíz de las plantas control sin diferencias significativas entre ambas (Figura 3A). Utilizar la longitud de la raíz como parámetro para medir la tolerancia a Zn durante periodos de tiempo prolongados en placas de agar es complicado debido al extenso desarrollo de raíces laterales. Por tal motivo, se eligió la biomasa como segundo parámetro para evaluar las diferencias en la tolerancia a Cu y Zn entre líneas transgénicas y silvestres crecidas durante 14 días (Figura 3C). En medio sin suplemento de Cu, es indistinguible la biomasa de las plantas silvestres y de las que sobreexpresaban *mt4a*. En presencia de 100 μM CuSO_4 ó 200 μM ZnCl_2 , la biomasa de las plantas silvestres se redujo significativamente entre un 32% y 40%, respectivamente, mientras que las plantas que sobreexpresaban *mt4a* su biomasa se afectó de forma mínima cuando fueron tratadas con Cu o Zn.

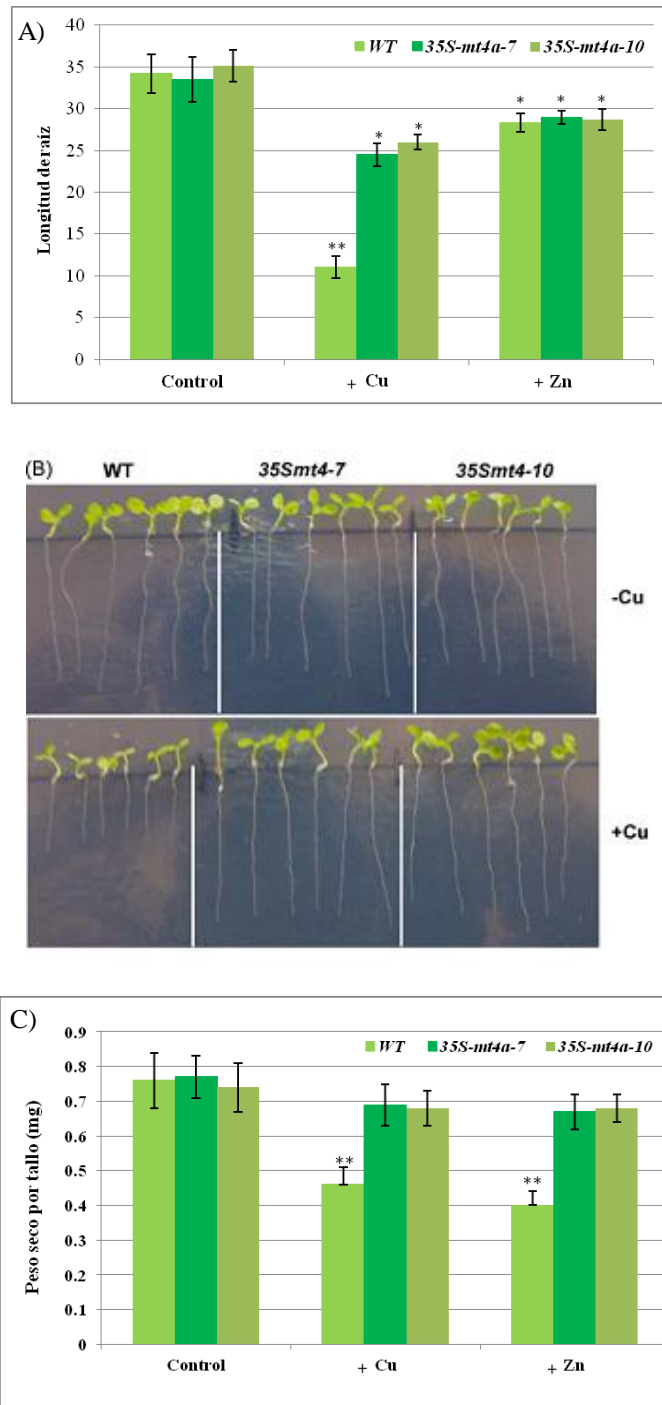


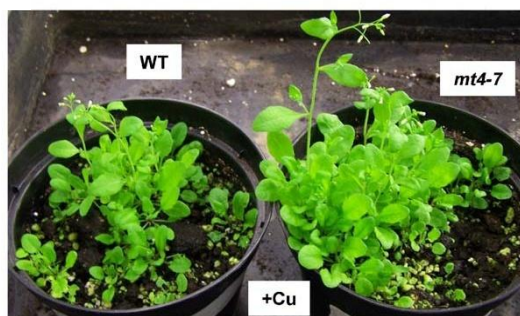
Figura 3. Tolerancia de plantas silvestres y transgénicas que sobreexpresan el gen *mt4a* de *A. thaliana*. (A) Longitud de la raíz de plántulas control de 7 días de crecimiento y plántulas transgénicas crecidas en ausencia o presencia de metal. Las semillas se germinaron y crecieron en medio MS durante 3 días y fueron posteriormente transferidas a medio fresco MS (control) o a medio con 100 mM CuSO₄ (+Cu) ó 200 μM ZnCl₂ (+Zn). El crecimiento de las plántulas se midió después de 4 días (B) Longitud de la raíz de las líneas control y las que sobreexpresan *mt4a* en medio MS y medio con 100 mM CuSO₄ (+Cu). Se muestran plantas representativas. (C) Análisis cuantitativo del peso seco de *A. thaliana* silvestre y de las líneas transgénicas *mt4a-7* y *mt4a-10*. Las semillas se germinaron en medio MS durante 3 días y se transfirieron más tarde a medio MS fresco con 100 mM CuSO₄ (+Cu) ó 200 mM ZnCl₂ (+Zn). El peso seco se determinó en plántulas de 7 días. Las barras de error representan la desviación estándar de un número de 20 plántulas. Las diferencias significativas se calcularon por el test de Student y se indican por uno ($p < 0,05$) o dos ($p < 0,01$) asteriscos

4. Tolerancia y acumulación de Cu y Zn en plantas transgénicas maduras de *A. thaliana*

Las semillas transgénicas y silvestres se cultivaron en invernadero en macetas con tierra comercial. Pasada una semana, las plantas se regaron con 150 μM de CuSO_4 ó 200 μM de ZnCl_2 durante 3 semanas (Figura 4A). El 35% de las plantas silvestres paró de crecer en presencia de Cu, mientras que sólo el 15% de las plantas transgénicas se afectaron (Figura 4A). En relación al Zn, casi el 75% de las plantas control pararon su crecimiento cuando fueron regadas con la solución con el metal, mientras que el crecimiento de las plantas transgénicas no se vio visiblemente afectado (Figura 4B).

El análisis cuantitativo del peso fresco también reveló claras diferencias en la respuesta de las plantas silvestres y de las transgénicas por la exposición al metal (Tabla 2). Sin la presencia de metal, no se registraron diferencias apreciables en el peso fresco de plantas control ($10,85 \pm 0,93$ mg) y las líneas transgénicas *mt4-7* ($11,05 \pm 1,14$ mg) y *mt4a-10* ($10,78 \pm 0,84$ mg). El peso fresco de las plantas control se redujo entre un 30% y un 65% en presencia de Cu y Zn respectivamente. En cambio, las líneas transgénicas mostraron una menor reducción en el peso fresco cuando fueron expuestas a Cu y Zn, alrededor de un 15% y un 12%, respectivamente.

(A)



(B)



Figura 4. Tolerancia de plantas maduras silvestres y transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. (A, B) Representan las diferencias entre la biomasa de plantas silvestres (WT) y de líneas transgénicas *mt4a* de regadas con Cu o Zn respectivamente. 7 mg de semillas estériles se cultivaron en macetas con tierra

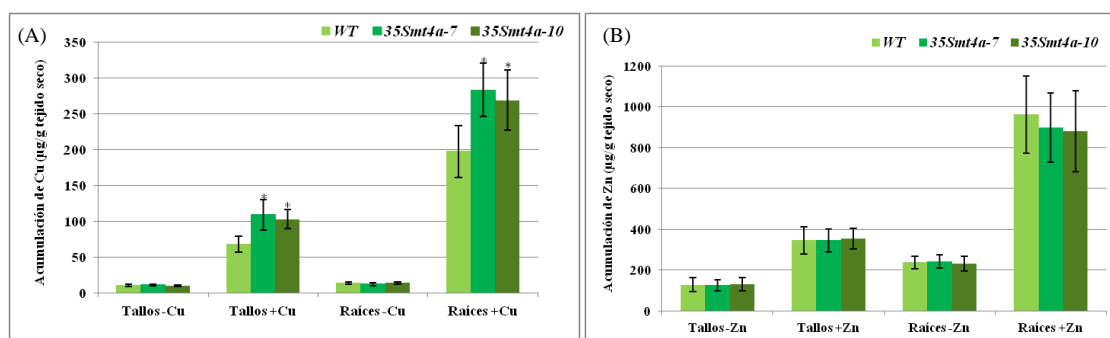
comercial en invernadero. Pasada una semana, las plantas se regaron con soluciones que contenían 150 μM CuSO_4 ó 200 μM ZnCl_2 durante 3 semanas más. Se muestra una serie de macetas representativas

Tabla 2. Análisis del crecimiento (% plantas viables) y del peso fresco (FW por planta) de plantas silvestres (wt) y de plantas transgénicas (*mt4a-7* y *mt4a-10*). Las plantas se regaron durante 3 semanas con 150 mM CuSO_4 ó 200 μM ZnCl_2 . Los datos representan \pm SE de tres experimentos diferentes (por cada experimento n=30)

	Wt		<i>mt4a-7</i>		<i>mt4a-10</i>	
	+Cu	+Zn	+Cu	+Zn	+Cu	+Zn
Crecimiento (%)	65 \pm 5	25 \pm 3	82 \pm 3	98 \pm 2	86 \pm 5	95 \pm 3
Peso seco (mg) por planta	7,52 \pm 0,59	3,79 \pm 0,63	9,44 \pm 0,81*	9,72 \pm 0,78*	9,07 \pm 0,72*	9,91 \pm 0,81*

Además, se determinó la acumulación de Cu y Zn tanto en plantas silvestres como en las líneas transgénicas *mt4a-7* y *mt4a-10*, ambas crecidas en un sistema hidropónico. Sin añadir ningún suplemento de un metal, no se observaron diferencias en el contenido de Cu y Zn en raíces y tallos de plantas transgénicas o silvestres (Figura 5A y B). Cuando las plantas silvestres se regaron con Cu, acumularon alrededor de 5 veces más metal en parte aérea y 10 veces más de metal en raíces (Figura 5A). Sin embargo, la expresión de *mt4a* en plantas transgénicas incrementó la acumulación de Cu entre un 30-40% más, en raíces y parte aérea, con respecto a las plantas silvestres (Figura 5A). Por el contrario, las plantas silvestres regadas con Zn, su acumulación de se incrementó entre 2,5 y 5 veces en la parte aérea y en las raíces, respectivamente. En contraste con el Cu, la concentración de Zn no se incrementó en las líneas transgénicas en comparación con las plantas silvestres (Figura 5B).

Así mismo, se calculó también el factor de translocación (FT) tanto de las plantas control como de las transgénicas en presencia de ambos metales. El FT fue prácticamente el mismo para las plantas control en presencia tanto de Cu como de Zn. Con respecto a ambas plantas transgénicas, el FT se incremento, sin diferencias significativas, de forma muy ligera en presencia de ambos metales (Figura 5C).



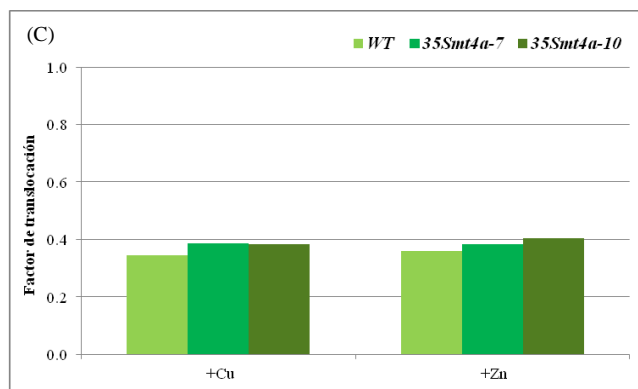


Figura 5. Acumulación en plantas silvestres (WT) y plantas transgénicas (*mt4a-7* y *mt4a-10*). (A) Contenido de Cu en tallos y raíces de plantas crecidas en medio control (control) o regadas durante 3 días con 150 μM CuSO_4 (+Cu). (B) Contenido de Zn en parte aérea y raíces de plantas crecidas en medio control (control) o regadas durante 3 días con 200 μM ZnCl_2 (+Zn). Los datos que se representan muestran \pm SE de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de las plantas silvestres fueron determinadas por el test de "Student" ($p < 0,05$) y están indicados con un asterisco. (C) Factor de translocación de las plantas silvestres (WT) y de las plantas transgénicas (*mt4a-7* y *mt4a-10*) en presencia de Cu y Zn

DISCUSIÓN

Las metalotioneínas son una familia de proteínas ricas en cisteínas que juegan un papel importante en la tolerancia a metales y su homeostasis (Hassinen y col., 2011). Todas ellas son capaces de unir metales como Cu, Zn, Cd, Hg y Pb, aunque tienen una alta afinidad para Cu y Zn (Henkel y Krebs, 2004). En el genoma de *A. thaliana* hay 9 genes de MTs (NC_003071.7). Recientemente, se ha descifrado la contribución individual de las diferentes MTs de *A. thaliana* y su papel en la homeostasis y tolerancia a metales pesados (Guo y col., 2008). Además de esta función, se han descrito nuevos papeles para algunas MTs de plantas, como la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhu y col., 2009).

La sobreexpresión de proteínas de otros organismos en plantas para la mejora de la acumulación o de la tolerancia a metales es una metodología que se ha venido utilizando cada vez más en los últimos años (Eapen y D'Souza, 2005; Doty y col., 2008; Mello-Farias y Chaves, 2008; Pajuelo y col., 2014). Desde hace casi veinte años, se ha descrito una correlación entre la sobreexpresión de diversos genes de MTs y un aumento de la tolerancia a Cu y Cd cuando estas plantas son expuestas a dichos metales (Murphy y Taiz., 1995, Karenlampi y col., 2000, Krämer y Chardonnens, 2001). Aunque, la mayoría de estos estudios se centran en la expresión de las MTs tipo 1 y 2, ya que fueron las primeras descubiertas. En este capítulo, sin embargo, se han descrito los experimentos realizados para probar cómo la expresión del gen *mt4a* mejora la

tolerancia en *A. thaliana*. En particular, la MT empleada en este caso, *mt4a*, posee una alta afinidad por Zn comparada con otras isoformas de MTs, protegiendo a las plantas frente a la toxicidad producida por este metal. Ya en ensayos en levaduras se ha comprobado la capacidad de este tipo de MT para proporcionar tolerancia e incluso potenciar la acumulación de Zn (Guo y col., 2008).

Los ensayos de tolerancia y acumulación en *A. thaliana* realizados, se abarca todos los estados diferentes de desarrollo de la planta: desde la germinación de las semillas, hasta en plantas de corto periodo de crecimiento (entre 7-14 días) y en plantas maduras de un mes. En relación a la germinación, la sobreexpresión de *mt4a* no mejoraba este proceso ni en presencia de Cu ni de Zn. Además, estos dos metales no se han descrito como inhibidores de la germinación (Li y col., 2005). Por otra parte, es en el desarrollo más temprano de la plantas control, donde se ha observado mayor sensibilidad a los efectos tóxicos del Cu y del Zn, ya que se produce una disminución en el crecimiento de la raíz y en la biomasa. Esta disminución en la longitud de raíz y en la biomasa, también fue descrita por Li y col., (2005) cuando expusieron plantas de *A. thaliana* a varios metales. Sin embargo, al sobreexpresar el gen *mt4a*, no se ha observado una disminución de ésta. Este hecho puede ser debido a que se produce un aumento de la tolerancia a Cu y la planta es capaz de continuar con su crecimiento en exposición tanto a Cu como a Zn. Esta protección que se produce frente a ambos metales también se ha observado en plantas maduras de 30 días de crecimiento, en las que se producía un aumento de la biomasa y de la viabilidad de éstas.

En relación con la acumulación de Cu o Zn, también se midió en plantas maduras de 30 días. En plantas no hiperacumuladoras como es *A. thaliana*, la acumulación se produce mayoritariamente en la raíz ya que una translocación hacia los tallos aumenta la toxicidad de los metales al ser estos inhibidores de la de la fotosíntesis (Sharma y Agrawal, 2005). De hecho, la fotosíntesis es uno de los proceso más inhibidos por la presencia de Cu, debido a su efecto sobre el transporte de electrones en los tilacoides (Yruela, 2005; Cambrollé y col., 2008; Pàdua y col., 2010) Por consiguiente, tanto las plantas control como las transgénicas acumularon tanto Cu como Zn mayoritariamente en la raíz aunque con diferencias, posiblemente debidas a una mayor afinidad de las MTs por el Cu con respecto al Zn. Es más, se ha demostrado con anterioridad que la detoxificación de Cu ocurre principalmente por esta vía de MTs y no por otro tipo de quelantes de metales (Callaham y col., 2006).

En general, la sobreexpresión de genes de MTs se correlaciona con incrementos en la tolerancia a metales pesados (Misra y Gedanu, 1989; Pan y col., 1994), si bien en algunos casos también se han descrito incrementos moderados en la acumulación de Cu y Cd (Evans y col., 1992; Hasegawa y col., 1997). En este caso, los resultados sugieren que la expresión del gen *mt4a* en tejidos de *A. thaliana*, aumenta claramente la tolerancia tanto a Cu como a Zn aunque la acumulación sólo se aumenta ligeramente en el caso de plantas maduras regadas con Cu, ya que en el caso del Zn, el aumento de la tolerancia no está seguido de un aumento en la acumulación (Rodríguez-Llorente y col., 2010). Por otra parte, la expresión del gen *mt4a* no parece afectar al FT, ni en presencia de Cu ni de Zn, ya que en el segundo caso la acumulación no se afecta, mientras que en el primero, el moderado incremento en la acumulación de Cu se produce tanto en parte aérea como en raíces, no afectando al valor de TF. Sin embargo, dado que se produce un incremento en la biomasa de raíces, las plantas modificadas acumulan un mayor contenido total de Cu y Zn, a consecuencia del incremento de la biomasa. La mayor tolerancia a MP de las líneas transgénicas avala su utilización como herramienta biotecnológica para la fitoestabilización de Cu/Zn en suelos.

**HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA 2:
PLANTAS COMPUESTAS DE MEDICAGO TRUNCATULA
EN LA BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS CONTAMINADOS CON COBRE y ARSÉNICO**

INTRODUCCIÓN

Las fabáceas (*Fabaceae*) son una familia de gran interés comercial y agronómico con máxima importancia a nivel mundial (Gramham y Vance, 2003; Abate y col., 2012). Entre esta familia se encuentran especies como el garbanzo (*Cicer arietinum*), la soja (*Glycine max*), la lenteja (*Lens culinaris*), la alfalfa (*Medicago sativa*), las judías (*Phaseolus vulgaris*), el guisante (*Pisum sativum*) entre otras. La importancia de estas especies radica en la utilización de su fruto o de sus hojas como alimento para humanos y para la ganadería, debido a que los granos secos separados de sus vainas tienen un alto valor nutritivo al ser una fuente importante de proteína, hidratos de carbono, hierro, zinc y magnesio (Serraj y Adu-Gyamfi, 2004; Saxena y col., 2010).

Una de las características de mayor importancia en esta familia es la posibilidad de captación de nitrógeno atmosférico mediante la asociación de tipo simbiosis mutualista con bacterias de distintos géneros como *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, etc. (Olroyd y Downie, 2008; Ferguson y col., 2010). Ésta simbiosis se produce mayoritariamente en la raíz después de un proceso de infección inducido por la propia planta, creándose así una estructura llamada nódulo en cuyo interior se realiza la fijación de nitrógeno (Udvardi y Poole, 2013). Esta asociación es beneficiosa para la bacteria, ya que la planta le aporta nutrientes en forma de carbono (succinato) (Udvardi y Poole, 2013). Junto con *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* es la leguminosa modelo aceptada siendo la herramienta usada para estudios tanto genéticos como funcionales (Tadege y col., 2009; Sprent y James, 2008).

La utilización de esta simbiosis para la eliminación de contaminantes se enmarca dentro de la rhizoremediación (Kuiper y col., 2004) y ha suscitado un gran interés en los últimos años (Reichman, 2007; Pajuelo y col., 2011; El Aafi y col., 2012). Desde el punto de vista de la biorremediación, este proceso se vislumbra muy atractivo, debido a que la raíz ofrece una amplia superficie para la colonización bacteriana, permite a los microorganismos desplazarse a zonas más profundas del suelo y entrar en contacto con más contaminantes (Pajuelo y col., 2014) mientras que el nitrógeno aportado al suelo mejora el establecimiento de nuevas plantas.

Para que la simbiosis leguminosa-rizobio pueda utilizarse en biorremediación de metales pesados, es necesario utilizar plantas leguminosas y rizobios tolerantes a éstos (Pajuelo y col., 2011; Ahmad y col., 2012). En el caso de no encontrar simbiosis

suficientemente tolerantes, la ingeniería genética permite obtener organismos con tolerancia a metales pesados incrementada (Pilon-Smits y Pilon, 2002). Por ejemplo, se han obtenido rizobios modificados genéticamente que expresan genes de MT en la superficie celular (Sriprang y col., 2002), de la fitoquelatina sintasa (Ike y col., 2007) o los genes *copAB* del operón de resistencia a Cu de *Pseudomonas* (Delgadillo y col., 2014), capaces de incrementar la tolerancia o acumulación de determinados metales pesados, o de incrementar la nodulación en condiciones de estrés por metales pesados. En el campo de la biorremediación, *Medicago* es un género muy útil debido a que presenta una mayor tolerancia a metales en comparación con otras plantas (Peralta-Videa y col., 2008). Como herramienta biotecnología en fitorremediación, la utilización de *Medicago* es muy adecuada por el hecho de que es capaz de fitoestabilizar metales en suelos (Chen y col., 2008; Zribi y col., 2014). Al contrario que en el caso de los rizobios, no se ha abordado la obtención de leguminosas modificadas genéticamente. Esto es debido a que la obtención de leguminosas transgénicas es más complicada, laboriosa y lenta que para *Arabidopsis*. Como alternativa se utilizan como modelo las plantas compuestas con parte aérea silvestre y raíces transgénicas. Las plantas compuestas aportan una serie de ventajas frente al uso de otros modelos como *Arabidopsis*. Entre estas ventajas se encuentra el hecho de que al ser transgénica sólo la raíz, la posibilidad de que se produzca una diseminación génica es nula, característica deseable cuando estamos hablando de la implantación de cultivos transgénico (Daniell, 2002). Por ello, se han utilizado con éxito para el estudio de procesos que ocurren en la raíz, como la nodulación (De Lorenzo y col., 2009; De Zélicourt y col., 2012), o en nuestro caso la biorremediación. Además, que la parte aérea sea silvestre evita que, aunque haya translocación del metal, está ocurra en alta proporción y pase así a la cadena alimentaria.

En este capítulo se ha abordado la obtención de plantas compuestas de *Medicago truncatula*, con capacidad de biorremediación o tolerancia incrementada a Cu y As. Para el caso del Cu, se ha expresado el gen de metalotioneína, *mt4a*, para mejorar la acumulación y/o tolerancia frente a Cu de *Medicago truncatula*.

En el caso del As, se procedió a expresar dos genes diferentes por separado *ERN* y *ENOD12*. La elección de ambos genes ha estado basada en estudios anteriores donde se ha demostrado que ambos se encuentran en condiciones de sobreexpresión cuando *Medicago truncatula* era expuesta a As (Lafuente y col., 2014). El gen *ERN* codifica un

factor de transcripción dependiente de etileno requerido para la nodulación, que actúa directamente regulando la transcripción de *ENOD11* a través de la activación de las regiones “NF-responsive, NF-box” (Cerri y col., 2012). El otro gen elegido para la transformación, *ENOD12*, está relacionado en el proceso de infección por la bacteria simbiótica (Scheres y col., 1990; Bauer y col., 1994).

Para obtener estas plantas compuestas, se utilizó el método de transformación por *Agrobacterium* (Tepfer, 1984), en el cuál, se puede introducir ADN exógeno en el genoma de la planta, a través de los plásmidos Ri y con la regeneración de las célula transformadas capaces de expresar la información introducida. Cuando para realizar esta ingeniería genética se utiliza *A. rhizogenes*, se generan de forma fácil y rápida raíces transgénicas (RT) (“hairy roots”). Al provocar una herida en la raíz silvestre, los compuestos fenólicos que exuda la raíz marcan el inicio de la infección por *A. rhizogenes* (Blanco y col., 2003) que es capaz de insertar en el genoma de la raíz un fragmento (T-DNA) del plásmido Ri. A partir de ese momento, se produce el crecimiento de una “raíz en cabellera”. En el T-DNA, se encuentran los genes *rol* (A, B, C y D) que alteran la fisiología de la planta.

RESULTADOS

1. Confirmación de la transgénesis de las raíces de *Medicago truncatula*

La confirmación de la expresión heteróloga de los genes *mt4a*, *ERN* y *ENOD12* en raíces transgénicas de *M. truncatula* se llevo a cabo mediante PCR. El gen se amplificó con los cebadores específicos de cada gen descritos en Materiales y Métodos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa tras la correspondiente electroforesis. Para el gen *mt4a*, se observó unas bandas de tamaño aproximado de 300 pb, correspondiente al tamaño de dicho gen (Figura 1A). Esto indica que las raíces de las plantas son transgénicas.

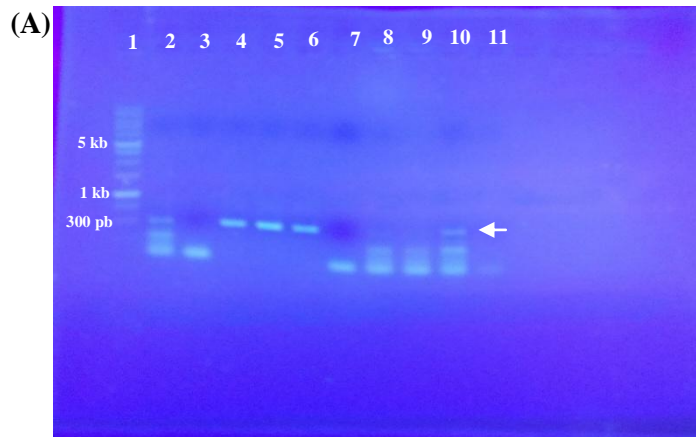


Figura 1. (A) Gel de agarosa en el que se observan las bandas correspondientes a la amplificación del gen *mt4a*. El carril 1 es el marcador de 1 kb. Los carriles 2, 4, 5, 6 y 11 muestran unos fragmentos de aproximadamente 300 pb que corresponde con raíces transgénicas que se han transformado satisfactoriamente y expresan el gen *mt4a*

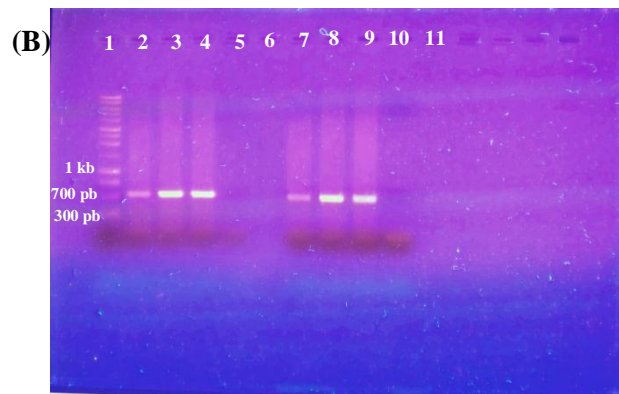


Figura 1. (B) Gel de agarosa en el que se observan las bandas correspondientes a la amplificación de los genes *ERN* y *ENOD12*. El carril 1 es el marcador de 1 kb. Los carriles 2, 3, 4 corresponden a unos fragmentos de aproximadamente 800 pb que son el gen *ERN*. Los carriles 7, 8 y 9 muestran unos fragmentos de aproximadamente 700 pb que corresponden al gen *ENOD12*. Los carriles 5, 6, 10 y 11 corresponden a plantas sin transformar

Además, como segunda comprobación, se utilizó la expresión del gen *GUS*. La presencia de este gen informador en el vector utilizado, codifica una enzima capaz de teñir las raíces transgénicas de color azul cuando se usa una solución de X-gluc (Jefferson y col., 1997). Las plantas transgénicas se visualizaron con la lupa (Figura 2A, D). Las raíces no transformadas mantienen el color blanco.

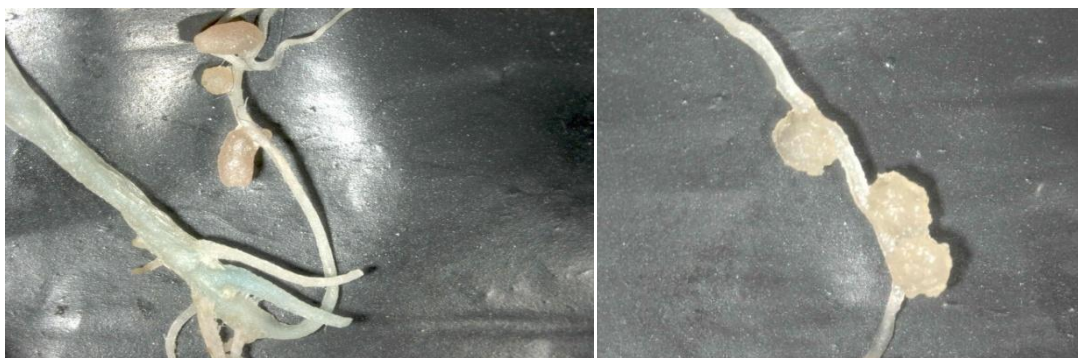


Figura 2. (A) Expresión del gen informador *GUS* en raíces transgénicas de *Medicago truncatula* cuando fueron teñidas con X-gluc. Estas muestran un tono azulado en el tallo. (B) Plantas de *Medicago truncatula* sin transformar que no expresan el gen informador *GUS* en los tallos y se muestran de color blanco

2. Estudios de la nodulación y de los parámetros fisiológicos de plantas compuestas de *Medicago truncatula* expuestas a diferentes concentraciones de Cu.

Para conocer si la expresión del gen *mt4a* en raíces de *M. truncatula* mejoraba la tolerancia a Cu, las plantas compuestas fueron depositadas en macetas cerradas estériles y se regaron con soluciones de medio BNM líquido suplementado con 100 y 200 μ M de Cu. Además, la inoculación se realizó con dos cepas diferentes de *Ensifer medicae* (MA11), una silvestre (MA11) y otra modificada genéticamente que expresa los genes *copAB* del operon de Cu de *P. fluorescens* Az13 (Delgadillo y col., 2014) (MA11-CopAB). La inoculación con la bacteria modificada genéticamente tenía el objetivo de comprobar si con esta estrategia se podía mejorar aún más la tolerancia y acumulación de Cu. Tras 28 días de exposición, las plantas se recolectaron y se procedió a la medición de los parámetros fisiológicos y de la nodulación.

El aspecto visual de las plantas fue muy diferente según expresaran el gen de *Arabidopsis* o no. Incluso sin la exposición a Cu adicional, el aspecto de las plantas compuestas que expresaban el gen *mt4a* fue muchísimo mejor que las control (Figura 3A). Esta tendencia se mantuvo a medida que se incrementaron las concentraciones de Cu (Figura 3 B, C).

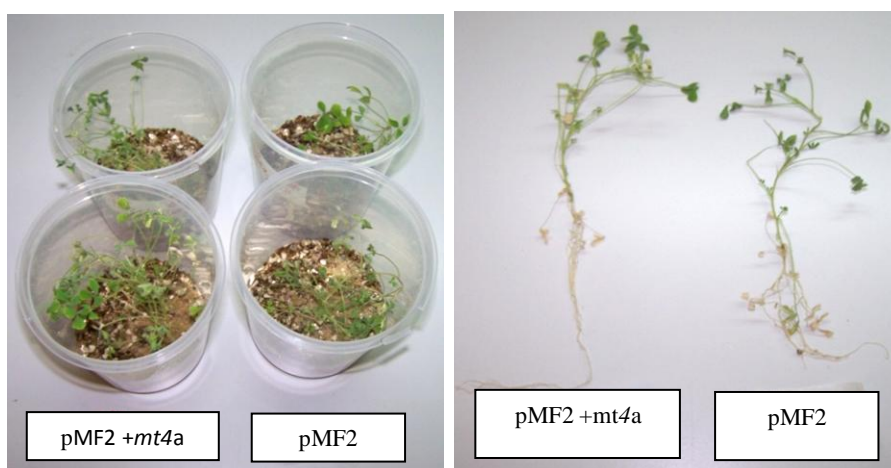


Figura 3A. Plantas compuestas de *Medicago truncatula* sin exponer a Cu

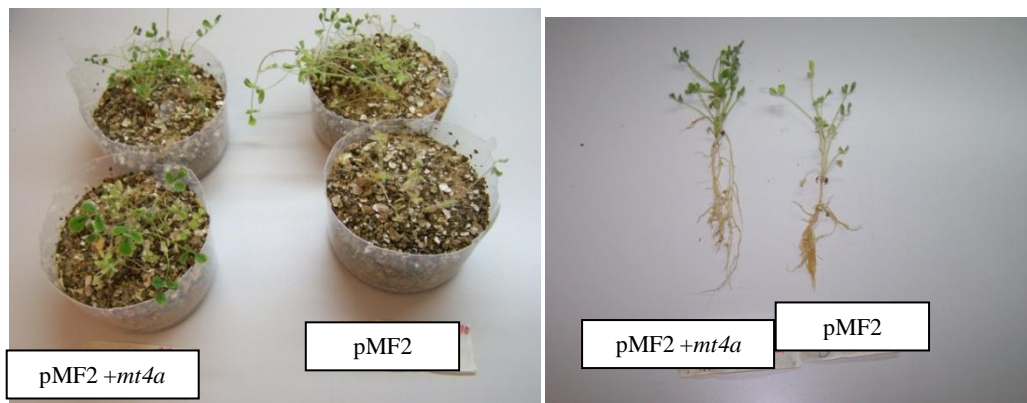


Figura 3B. Plantas compuestas de *Medicago truncatula* expuestas a 100 μ M de Cu

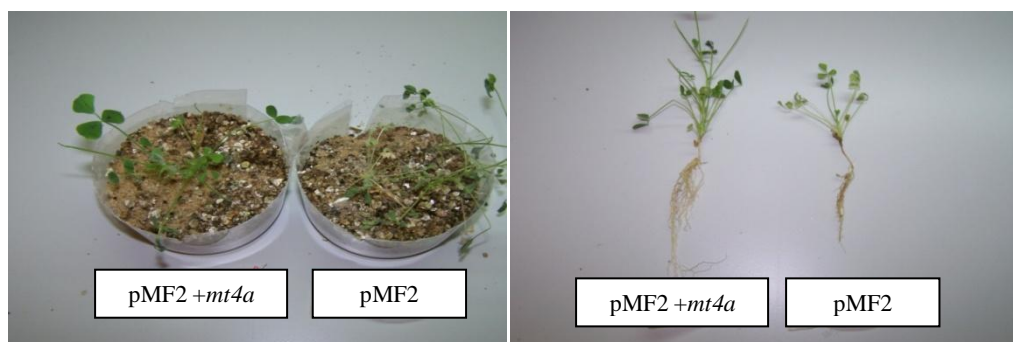


Figura 3C. Plantas compuestas *Medicago truncatula* expuestas a 100 μ M de Cu

Los parámetros medidos a parte del aspecto visual fueron: la longitud de la raíz, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz. La longitud de raíz de las plantas compuestas que no estaban expuestas a concentraciones de Cu externo, fue diferente según expresaran (11,5-11,8 cm) o no (8-9 cm) el gen *mt4a* (Figura 4). Se encontraron diferencias significativas por la expresión de dicho gen pero no por la inoculación con las diferentes bacterias (Figura 4). Cuando las plantas se expusieron a Cu (100 y 200 μ M) se observó que las plantas compuestas que expresaban el gen *mt4a* no presentaban raíces más cortas. En las plantas control, mientras que las que fueron inoculadas con MA11-*CopAB* no sufrieron disminución en la longitud de raíz, las inoculadas con MA11 vieron disminuido este parámetro de forma acentuada (Figura 4).

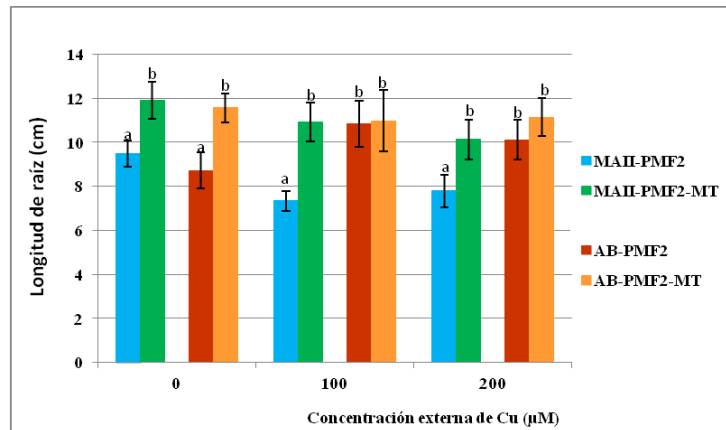


Figura 4. Longitud de la raíz de plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con MA11 y MA11-*copAB* y expuestas a diferentes concentraciones de Cu. Las barras de error muestran las desviaciones estándar de las medias realizadas sobre un n=20. Las diferentes letras muestran resultados significativamente diferentes con una $p < 0,05$

Se analizó la influencia de tres variables (expresión del gen *mt4a*, inoculación con MA11/ MA11-*copAB* y concentración de Cu) sobre la longitud de la raíz. En este caso, el factor que más influyó fue la inoculación con MA11/MA11-*copAB* dando mayor longitud de raíz las plantas inoculadas con la bacteria MA11-*copAB*. El segundo factor de mayor influencia fue la expresión de gen *mt4a*, de modo que las plantas compuestas que expresaban dicho gen presentaron una mayor longitud de raíz. Y finalmente el factor que menos influyó fue la concentración de Cu. En las plantas control se produce una disminución de la longitud de la raíz a medida que aumenta la concentración de Cu, mientras que en las plantas compuestas, especialmente aquellas que está inoculadas con MA11-*copAB* no se produce inhibición en el crecimiento de la raíz.

Con respecto al peso seco de la parte aérea, éste fue el doble en aquellas plantas que expresaban la *mt4a* en ausencia de suplementos de Cu (Tabla 1A). A concentraciones de 100 µM, los pesos secos de plantas compuestas inoculadas con MA11-*copAB* fueron iguales en el control y en las transgénicas, mientras que en las inoculadas con MA11, las que expresaban *mt4a*, presentaron un peso seco 33% mayor que las control (Tabla 1A). Cuando se aplicaron concentraciones externas de Cu de 200 µM, tanto en plantas control inoculadas con MA11 como con MA11-*copAB*, el peso seco disminuyó entre un 40-50%, mientras que las que expresaban el gen *mt4a* obtuvieron pesos secos dos veces superiores a las que no lo expresaban (Tabla 1A).

Analizando el peso seco en raíz, la tendencia fue distinta. En ausencia de Cu todas las raíces tuvieron el mismo peso seco excepto las que expresaban el gen *mt4a* inoculadas con MA11-*copAB* que tuvieron un peso seco superior (Tabla 1B). A 100 µM, todas las

raíces mantuvieron su peso seco. A concentraciones externas de Cu de 200 μM , las raíces control inoculadas con MA11-*copAB* redujeron su peso seco entre un 20-30% mientras que las expresaban el gen *mt4a* obtuvieron un peso seco de casi 25% más. Las raíces de las plantas inoculadas con MA11 no variaron su peso seco (Tabla 1B).

Tabla 1A. Pesos secos de la parte aérea de plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con MA11 o con MA11-*copAB* y expuestas a diferentes concentraciones de Cu

Parte aérea	MA11		MA11-CopAB	
	pMF2	pMF2+MT	pMF2	pMF2+MT
Sin Cu externo	33,3	63	39,5	68,3
100 μM Cu	34,66	51,3	50	57,3
200 μM Cu	21,66	41,3	20,6	42,3

Tabla 1B. Pesos secos de la raíces de plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con MA11 o con MA11-*copAB* y expuestas a diferentes concentraciones de Cu

Raíces	MA11		MA11-CopAB	
	pMF2	pMF2+MT	pMF2	pMF2+MT
Sin Cu externo	16,5	13,3	18	27
100 μM Cu	12,6	14	17,3	23,6
200 μM Cu	10	13	12,3	18,3

Otro parámetro medido fue el número de nódulos por planta. En ausencia de Cu, se observó una mejora ligera en el número de nódulos en las plantas que expresaban heterológicamente el gen *mt4a* en la raíz (8,5 nódulos por planta) frente a aquellas que no lo expresaban (plantas control) (5-6 nódulos por planta) (Figura 5). No se hallaron diferencias significativas entre la inoculación con las diferentes bacterias (Figura 5). En exposiciones a 100 μM de Cu, el número de nódulos descendió en plantas con raíces transgénicas que expresaban *mt4a*, a aproximadamente, 5 nódulos por planta mientras que las raíces control presentaban 3 nódulos por planta. En este caso las diferencias fueron debidas a la expresión del gen *mt4a*, no por la inoculación con los diferentes rizobios (Figura 5). Cuando la concentración de Cu externo alcanzó 200 μM , se observó una tendencia diferente. Mientras que las raíces control tenían 1,5 nódulos por planta, con ambas bacterias, en las raíces que expresaban el gen *mt4a* si mostraron resultados distintos en función del inoculante utilizado. En aquellas plantas inoculadas con la bacteria *E. medicae* MA11 el número de nódulos fue de 3,75 por planta, mientras que en las plantas inoculadas con la misma bacteria expresando los genes *copAB* el número de nódulos aumento se mantuvo en los 6,11 por planta (Figura 5).

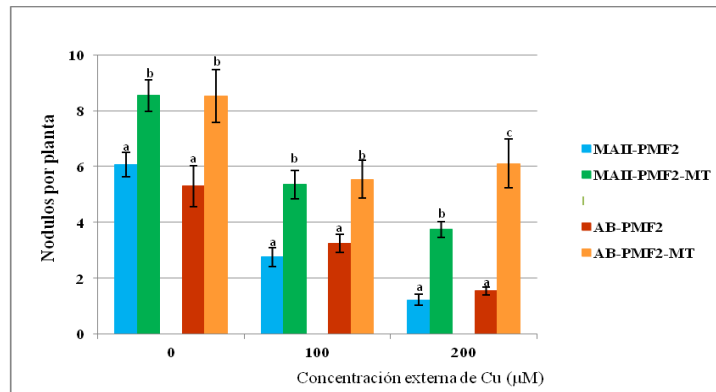


Figura 5. Número de nódulos por plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con *MA11* o con *MA11-copAB*, expuestas a 100 y 200 µM de Cu. Las barras de error muestran las desviaciones estándar de las medias realizadas sobre un n=20. Las diferentes letras muestran resultados significativamente diferentes con una $p < 0,05$

En este caso, la influencia de tres variables sobre la longitud el número de nódulos fue diferente. El factor que más influyó en la nodulación fue la concentración de Cu, disminuyendo en todos los casos drásticamente éste. El segundo factor en influencia fue la expresión del gen *mt4a*, mejorando la nodulación en todos los casos. Y por último, el factor con menos influencia fue la inoculación con *MA11/MA11-copAB* dando un mayor número de nódulos en las plantas inoculadas con la bacteria *MA11-copAB*.

3. Ensayos de acumulación de Cu en plantas compuestas de *Medicago truncatula*.

Tras la medición de todos los parámetros fisiológicos, las plantas fueron secadas en un horno a 80°C durante una semana y se analizó el Cu acumulado por técnicas de ICP-IOES (Margui y col., 2005). La cantidad de Cu acumulado fue medido independientemente en raíz y parte aérea. En ausencia de Cu externo, los valores obtenidos en acumulación de Cu fueron prácticamente los mismos entre todas las plantas compuestas, alcanzándose valores de entre 10 y 17 ppm en parte aérea y entre 28 y 38 ppm en raíz. Cuando las plantas compuestas fueron regadas con soluciones de BNM suplementadas con 100 y 200 µM de Cu, la acumulación en parte aérea se mantuvo, en todos los casos, entre 30-48 ppm (Tabla 2A). Sin embargo, la acumulación en la raíz de plantas compuestas inoculadas con la bacteria *MA11-copAB* fue de 140 a 180 ppm, mientras que las plantas inoculadas con la bacteria *MA11* acumularon en raíz entre 60-85 ppm cuando fueron sometidas a 100 µM, no pudiéndose determinar la acumulación en esta condición a 200 µM debido a la poca biomasa obtenida (Figura 5C) (Tabla 2B).

Tabla 2A. Acumulación de la parte aérea de plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con *MA11* o con *MA11-copAB* y expuestas a diferentes concentraciones de Cu

Parte aérea	<i>MA11</i>		<i>MA11-CopAB</i>	
	pMF2	pMF2+MT	pMF2	pMF2+MT
Sin Cu externo	17	17	11	10
100 μ M Cu	36	43	30	31
200 μ M Cu	37	41	42	48

Tabla 2B. Acumulación de la raíces de plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con *MA11* o con *MA11-copAB* y expuestas a diferentes concentraciones de Cu

Raíces	<i>MA11</i>		<i>MA11-CopAB</i>	
	pMF2	pMF2+MT	pMF2	pMF2+MT
Sin Cu externo	32	28	38	29
100 μ M Cu	61	81	162	185
200 μ M Cu	n.d	n.d	147	155

Estos resultados indican que la asociación simbiótica doblemente modificada genéticamente tiene un gran potencial en fitoestabilización de Cu. De hecho, el factor de traslocación de Cu disminuye en plantas compuestas que expresan *mt4a* e inoculadas con *MA11-CopAB* (Tabla 3), lo que significa que estas plantas acumulan e inmovilizan el metal en las raíces, limitando la traslocación a la parte aérea.

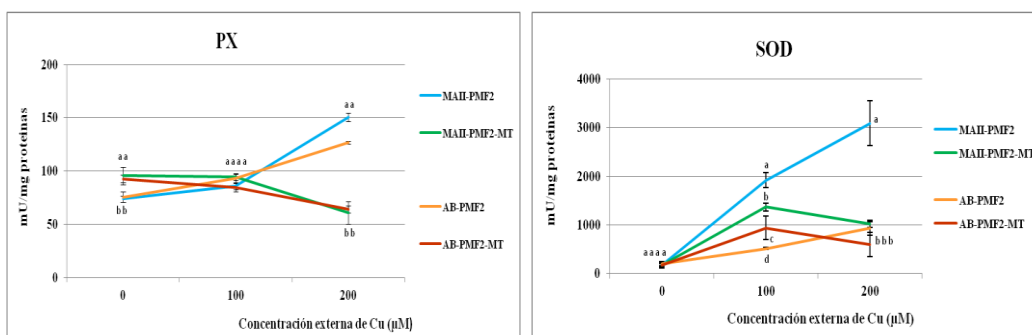
Tabla 3. Factores de traslocación de plantas compuestas de *Medicago truncatula* inoculadas con *MA11* o con *MA11-copAB* y expuestas a diferentes concentraciones de Cu

TF	<i>MA11</i>		<i>MA11-CopAB</i>	
	pMF2	pMF2+MT	pMF2	pMF2+MT
Sin Cu externo	0,53	0,60	0,28	0,34
100 μ M Cu	0,59	0,53	0,18	0,16
200 μ M Cu	n.d.	n.d.	0,28	0,30

4. Medición de parámetros de estrés oxidativo para la comprobación de la mejora de tolerancia a Cu en plantas compuestas de *Medicago truncatula*.

Para evaluar si la expresión del gen *mt4a* en raíces de *M. truncatula* mejoraba la tolerancia a Cu cuando éstas eran expuestas a diferentes concentraciones de dicho metal, se midieron una serie de parámetros que indican el estrés oxidativo y el daño a membranas, como las enzimas antioxidantes (PX, SOD, APX y CAT) y la peroxidación lipídica (MDA).

Tanto las actividades de las enzimas como la peroxidación lipídica se midieron en ausencia de Cu externo (nivel basal) y a las concentraciones ensayadas para la acumulación y estudios de nodulación y parámetros físicos (100 y 200 μM). En ausencia de suplementos de Cu, sólo la actividad PX fue ligeramente superior en las raíces que expresaban el gen *mt4a* (Figura 6A). En el resto de las actividades enzimáticas los registros obtenidos no mostraron diferencias algunas. A concentraciones de 100 μM , la tendencia fue diferente según la enzima. En la actividad PX los valores de actividad obtenidos fueron los mismos para todas las plantas (Figura 6A). En la actividad SOD, cada valor obtenido fue notoriamente diferente de los demás, siendo el más alto el obtenido por plantas control inoculadas con MA11 (Figura 6B). Para la actividad APX, los valores se dividieron visiblemente en dos grupos. Los valores más elevados correspondieron a las plantas inoculadas con MA11 mientras que los más bajos a la inoculadas con MA11-*copAB* (Figura 6C). Por último en la actividad CAT, solo fue significativamente superior el valor de raíces control inoculadas con MA11 (Figura 6D). Con respecto a concentraciones de 200 μM , la actividad PX mostró unos valores claramente más bajos para raíces que expresaban *mt4a*, independientemente de la bacteria utilizada en la inoculación (Figura 6A). En la actividad SOD, solo fue superior el valor de las raíces control inoculadas con MA11 (Figura 6B), mientras que en la actividad APX todos los valores fueron prácticamente similares (Figura 6C). En la actividad CAT sólo el valor obtenido en raíces que expresan *mt4a* inoculadas con MA11-*CopAB* fue palpablemente inferior (Figura 6D).



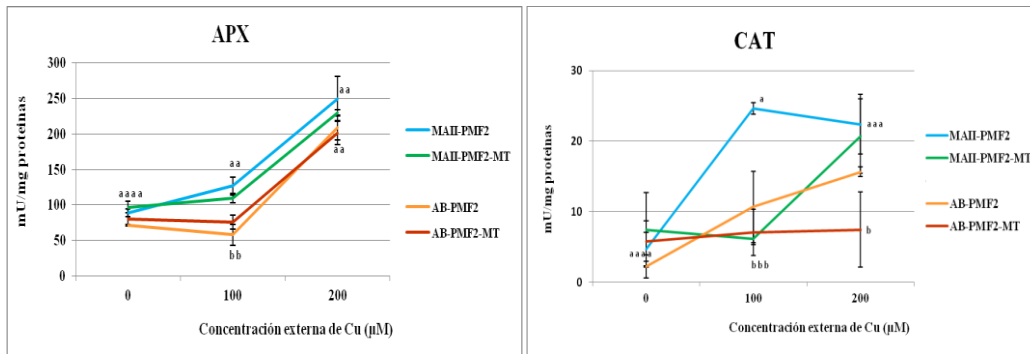


Figura 6. (A) Actividad enzimática PX de plantas compuestas de *M. truncatula* expuestas a concentraciones de 100 y 200 μM de Cu. (B) Actividad enzimática SOD de plantas compuestas de *M. truncatula* expuestas a concentraciones de 100 y 200 μM de Cu. (C) Actividad enzimática APX de plantas compuestas de *M. truncatula* expuestas a concentraciones de 100 y 200 μM de Cu. (C) Actividad enzimática CAT de plantas compuestas de *M. truncatula* expuestas a concentraciones de 100 y 200 μM de Cu

En general, se puede concluir que los valores más elevados de las actividades enzimáticas correspondieron a las plantas control inoculadas con MA11, mientras que los valores más bajos correspondieron a las plantas que expresaron *mt4a* inoculadas con MA11-CopAB.

La peroxidación lipídica se midió por el contenido en MDA de las plantas expuestas a las concentraciones de Cu anteriormente descritas y sin Cu externo como control. En ausencia del metal, los valores de MDA obtenidos fueron todos aproximadamente los mismos (Figura 7). Cuando la concentración de Cu aumenta, los datos se dividen en dos grupos, de modo que el factor que más afectó fue la bacteria: las plantas inoculadas con MA11-copAB tuvieron los valores más bajos de MDA. A 100 μM , el mayor valor lo alcanzaron las raíces control inoculadas con MA11, mientras que las demás, no obtuvieron valores sensiblemente diferentes (Figura 7). A 200 μM , los valores de las plantas control inoculadas con MA11 se mantuvieron en valores similares a los obtenidos en 100 μM , mientras que las plantas que expresaban *mt4a* inoculadas con la misma bacteria, subieron ligeramente el contenido en MDA (Figura 7). Las plantas inoculadas con la cepa MA11-copAB mantuvieron el mismo valor que alcanzaron en concentraciones de 100 μM (Figura 7).

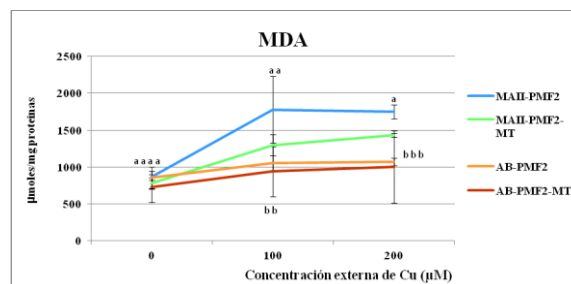


Figura 7. Contenido en MDA en plantas compuestas de *Medicago truncatula* expuestas a concentraciones de Cu externas de 100 y 200 μM

Los resultados sugieren que las plantas control inoculadas con MA11 presentaron los niveles más altos de peroxidación lipídica, mientras que el doble sistema transgénico presentó un menor daño a las membranas.

Debido a que todos estos valores de actividades enzimáticas y peroxidación de lípidos por separado no ofrecen una visión global del estrés oxidativo, se propuso un nuevo índice de estrés oxidativo (OSI). El OSI se definió como un parámetro global que indica el incremento del estrés oxidativo frente al incremento de concentraciones de Cu externo. Un valor de 1 en el OSI indica que las raíces expuestas tienen un nivel similar de estrés a las no expuestas (control). Valores superiores a 1 indican un aumento del estrés oxidativo, incrementándose éste en paralelo con los valores de OSI. En raíces transgénicas control inoculada con MA11, alcanzó un OSI de 5,59 a 200 μM . Éstas mismas raíces control inoculadas con la bacteria transformada mostraron un OSI menor de 3,61 a 200 μM (Figura 8). Por el contrario las raíces que expresaban el gen *mt4a*, a 200 μM mostraron un OSI sensiblemente más bajo de aproximadamente 2. Estos datos sugieren que en las plantas control el estrés producido al aumentar la concentración de Cu de 100 a 200 μM , aumenta a un ritmo 14 veces superior al de las plantas que expresan *mt4a*, y esto es independiente de la bacteria utilizada para la inoculación (Figura 8).

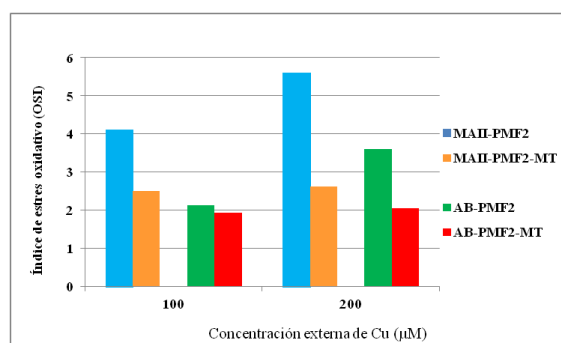


Figura 8. Índice OSI de plantas compuestas de *Medicago truncatula* por la exposición a Cu

5. Sobreexpresión de los genes *ERN* y *ENOD12* en raíces de plantas compuestas de *M. truncatula* para la mejora de la nodulación frente a *As*.

Con el propósito de evaluar la capacidad de mejora en la nodulación frente a *As*, se generaron plantas compuestas de *M. truncatula* que expresaban individualmente dos genes diferentes *ERN* y *ENOD12*. Las plantas que expresaban el gen *ERN* (Figura 9) no mostraron un aumento notorio en la biomasa de su parte aérea y en el número de trifolios en comparación con las plantas control (transformadas con el vector vacío pMF2). Sin embargo, en la longitud de raíz sí que hubo diferencias visibles entre las plantas compuestas y los controles debido a que la expresión del gen *ERN* fue capaz mantener el crecimiento en la raíz aun en condiciones de toxicidad por el *As* (Figura 11C y Figura 12). En El número de nódulos, no se encontraron diferencias significativas en el número de nódulos en ausencia de *As*, mientras que se encontró incrementado hasta 3 veces en presencia de *As* (Figura 11E y Figura 12) aunque estos valores no fueron tan drásticos debido a la heterogeneidad que mostraron las raíces transgénicas. Con respecto a las plantas compuestas que expresan *ENOD12* (Figura 11), no hubo un incremento significativo en los parámetros medidos en los tallos (biomasa y número de trifolios) en comparación con las plantas control. Tampoco hubo diferencias en la longitud de raíz (Figura 11C y Figura 12). Sin embargo, en este caso la expresión del gen *ENOD12* incrementó hasta 2 veces el número de nódulos en plantas sin exponer a *As* y en 10 veces en presencia de éste (Figura 10E y Figura 12).

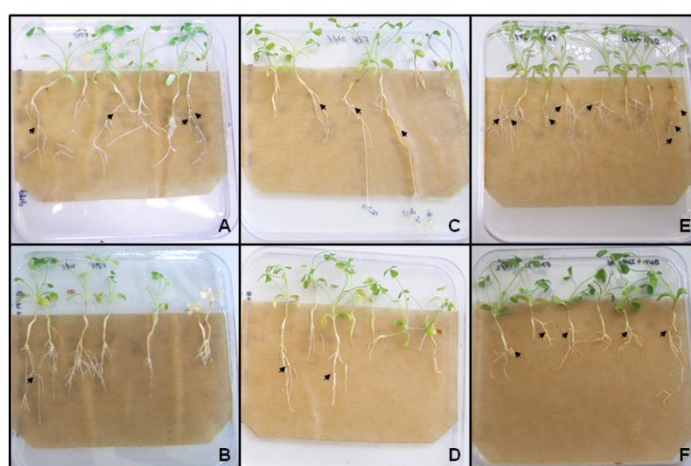


Figura 11. Expresión de los genes *ERN* y *ENOD12* en plantas compuestas de *Medicago truncatula*. En la figura C y D se muestra las plantas compuestas que expresan *ERN* y en la figura E y F las que expresan el gen *ENOD12*. En la figura A y B están representadas las plantas control con el vector vacío. Las plantas se cultivaron en ausencia (A, C, E) o presencia (B, D, F) de *As* y fueron inoculadas con *Ensifer medicae*

MA11. Las fotos corresponden a plantas 28 días después de ser inoculadas. Las flechas indican la posición de los nódulos

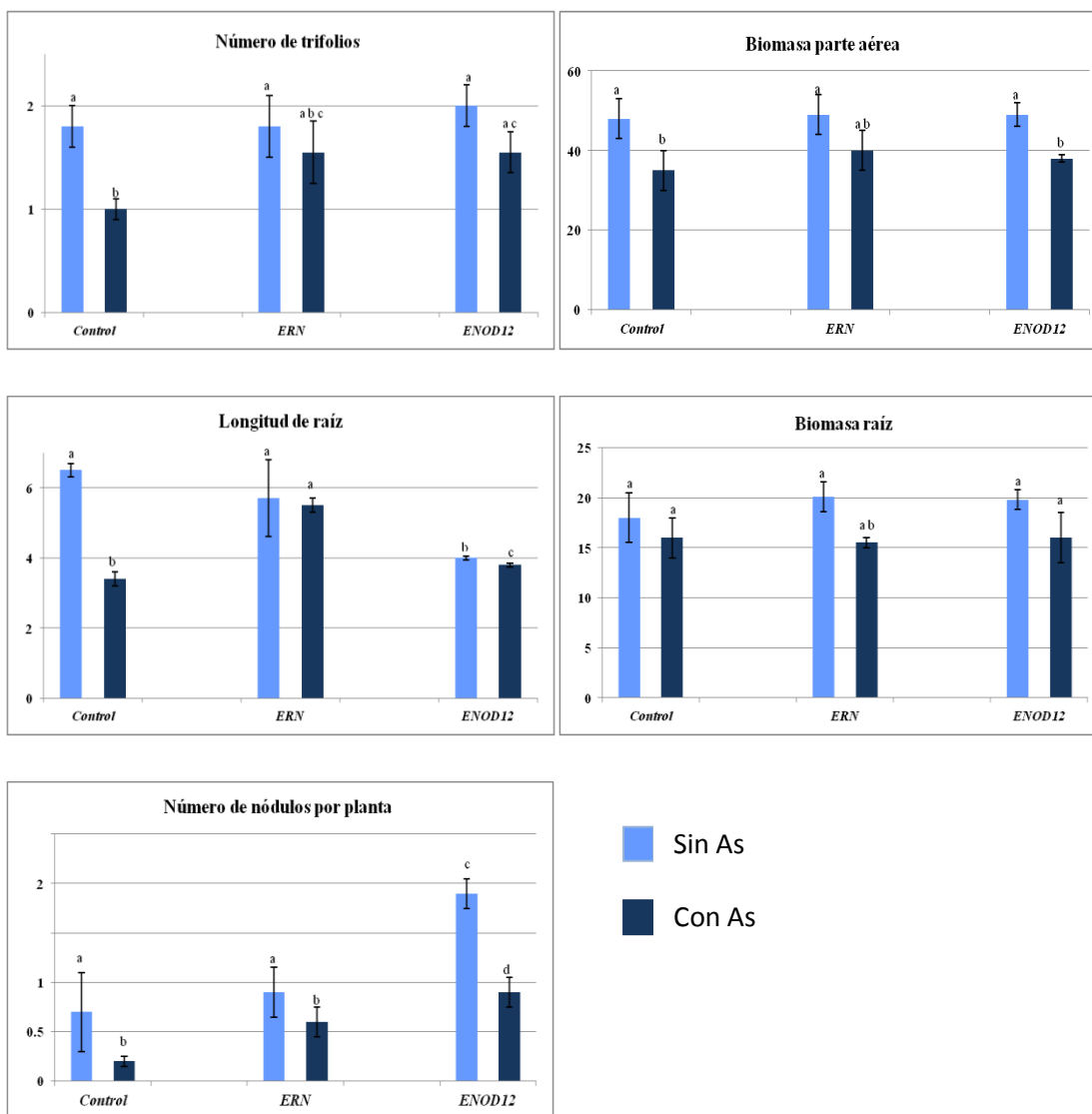


Figura 12. Parámetros de crecimiento y nodulación de plantas compuestas de *M.truncatula* que expresan o el factor de respuesta a etileno (*ERN* o *ENOD 12*). Se determinaron: número de trifolios, biomasa de la parte aérea y de la raíz, longitud de raíz y número de nódulos por planta después de 28 días de la inoculación en presencia o ausencia de As. Los datos son medias de entre 19-25 plantas. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) están indicadas con diferentes letras

DISCUSIÓN

Medicago truncatula es junto con *Lotus japonicus*, el modelo de leguminosas en investigación, con una importante contribución en estudios de biología de plantas (Rose y col., 2008). Pero, aparte de proporcionar información en biología básica, existe la posibilidad de una fácil mejora genética de estas plantas abriendo un abanico de opciones en el campo de la biorremediación. A la hora de usar leguminosas para la mejora y biorremediación de suelos, es importante también determinar el efecto que esa

contaminación produce en las interacciones simbióticas (Pajuelo y col., 2008; Lafuente et al., 2010, 2014).

En este capítulo, se ha examinado la capacidad y viabilidad del uso de *Medicago truncatula* como herramienta en biorremediación de suelos. Para ello, se expresó el gen *mt4a*, de *Arabidopsis thaliana*. Para comprobar si la expresión de dicho gen mejoraba la tolerancia de las plantas compuestas de *M. truncatula*, se midieron diversos parámetros fisiológicos y bioquímicos. Con respecto al aspecto visual de las plantas, aquellas que expresaban el gen se encontraron más verdes y con una raíz más robusta y con más superficie. Estos resultados se dieron tanto en presencia como en ausencia de Cu adicional en el medio de riego. Para incrementar la fiabilidad de esta observación, se midieron también otros parámetros fisiológicos. Uno de ellos, la longitud de raíz, es ampliamente usado y aceptado como marcador de toxicidad (Pahlsson, 1989). En ausencia de Cu adicional en el medio, las plantas compuestas *mt4a*, mostraron un incremento en su longitud de raíz con respecto a las plantas control. Este hecho podría atribuirse a que la sobreexpresión de *mt4a*, produciría una quelación del Cu como micronutriente, fomentando el crecimiento de la planta (Fageria y col., 2002). En condiciones de exposición a Cu, las plantas que expresaron el gen *mt4a* mantuvieron su longitud de raíz. Este efecto fue el mismo al inocular con la bacteria MA11-*CopAB*. En condiciones de toxicidad por el Cu, la MT actuaría como quelante del metal y éste dejaría de estar biodisponible por la que se encontraría limitada su toxicidad. De hecho, la unión a MTs y ácidos orgánicos son los principales mecanismos de detoxificación de Cu, el cual es posteriormente almacenado bien en vacuolas o en la pared vegetal, o en células especializadas como las células epidérmicas o los tricomas (Cobbet y Goldsbrough, 2002; Hall, 2002; Pilon-Smits, 2005), mientras que en el citoplasma el Cu está siempre unido a chaperonas que lo distribuyen a los orgánulos y metaloproteínas adecuadas (Yruela, 2005).

El número de nódulos por planta, es al mismo tiempo, un parámetro importante que se ve afectado sensiblemente por la presencia de metales como el Cu (Kopittke y col., 2007). Los nódulos son órganos cruciales en la interacción planta-leguminosa debido a que es donde se produce la fijación de N₂ atmosférico, por lo que una reducción en su número causa un deterioro en la salud de la planta (Rifat y col., 2010). En condiciones normales de ausencia de suplementos de Cu externo, se observó un incremento del número de nódulos en plantas con el gen *mt4a* con respecto al control. Cuando todas las

plantas fueron expuestas a Cu, disminuyeron su número de nódulos. Pero, mientras que en las plantas control la reducción fue de un 80%, en las plantas con el gen *mt4a* la reducción fue sólo de un 60%. Esta menor reducción en el número de nódulos podría ser la razón por la que las plantas *mt4a* muestran un mejor color y parecen más saludables al seguir produciéndose la fijación de nitrógeno incluso bajo condiciones de estrés.

Para confirmar el incremento producido en la tolerancia a Cu, debido a la expresión de *mt4a*, se procedió a medir distintas actividades enzimáticas y otros parámetros como la peroxidación lipídica de las membranas. El Cu es un poderoso productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la vía Haber-Weiss, por la reacción de Fenton y por la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ . También indirectamente por vía enzimática al activarse la polifenol oxidasa, lipooxigenasa (LOX) y NADPH oxidasa (Sharma y Dietz., 2008). Para aliviar estas ROS, las plantas han desarrollado un sistema de defensa antioxidante que incluye enzimas como SOD, APX, PX y CAT (Mittler y col., 2002). El agua oxigenada (H_2O_2), es una de las muchas ROS y es además un subproducto de la actividad enzimática de la SOD que es eliminado al convertirlo en H_2O por enzimas como APX, PX y CAT. Así que, la medida de estas enzimas es aceptada como un marcador de estrés oxidativo (Zhou y col., 2007). El nódulo de las leguminosas es un órgano muy sensible a la acción de los ROS porque el estrés oxidativo produce una batería de efectos tóxicos y como resultado final su senescencia (Puppo y col., 2005). Todos los valores en las actividades enzimáticas medidas se incrementaron a medida que se aumentaba la concentración de Cu externa, alcanzando su valor máximo a 200 μM . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wang y col., (2011) donde todas las actividades enzimáticas se incrementaban también debido a la exposición a Cu. Centrándonos en la actividad CAT, estos datos obtenidos en el capítulo sí eran iguales a los de Wang y col., (2011) pero sin embargo, contrastaban con otros estudios como los de Srivastava y col. (2006) y Posmyk y col., (2009), en los cuales se mostró un descenso en esta actividad en diversos tipos de plantas cuando se exponían a Cu. Sin embargo, la forma en que se incrementaba cada actividad en cada condición no fue la misma para todas las actividades medidas. Las plantas con el gen *mt4a* mostraron un aumento más suave en cada actividad enzimática pudiendo ser esto indicativo de menores síntomas de estrés. Inocular con la bacteria modificada genéticamente contribuye aún más a que este incremento sea menor, e incluso en algunos casos, casi ni

se produzca. Centrándonos en los datos del daño a las membranas, la peroxidación lipídica ya ha sido registrada en otros estudios como en células de *Scenedesmus sp.* y de tomate bajo exposiciones a Cu (Tripathi y col., 2006). Este daño a las membranas se mide por el contenido en MDA (Panda y col., 2008). Las plantas inoculadas con la bacteria MA11 alcanzaron casi el doble en contenido en MDA en comparación con las plantas inoculadas con MA11-*CopAB* cuyo contenido en MDA se incrementó de forma más ligera indicando un menor daño a las membranas.

Para concluir y tener una visión global de todos los síntomas de estrés, se ha introducido un nuevo parámetro. Se trata del índice de estrés oxidativo (ISO) que pretende unir todas las tendencias en los marcadores de estrés en respuesta a las concentraciones de Cu. En plantas con *mt4a*, alcanzaron valores entre 1,95 y 2. En contraste, las plantas control tuvieron valores muy superiores entre 3,6 y 5,5. Estos mayores valores de OSI de las plantas compuestas control sugiere que al expresar el gen *mt4a*, se traduce en un incremento de tolerancia al metal.

En relación a la acumulación de Cu, este hecho es muy importante en biorremediación. En el capítulo anterior se observó que sobreexpresar *mt4a* en *A. thaliana* mejoraba significativamente la acumulación de Cu tanto en tallos como en raíces (Rodríguez-Llorente y col., 2010). Pero en plantas no hiperacumuladoras, como *A. thaliana*, altos niveles de Cu pueden causar toxicidad debido a la inhibición del aparato fotosintético (Clijsters y Van Assche., 1985; Yruela, 2005). En otras plantas se ha descrito una correlación entre la expresión de genes de MTs y la tolerancia frente a otros metales como el Zn, Cd, etc. (Maiti y col., 1989; Misra y Gemadu., 1989; Pan y col., 1994 (a,b); Murphy y Taiz., 1995). En nuestro estudio, no hubo un incremento en la acumulación en parte aérea de las plantas, más bien se produjo una disminución de la traslocación a la parte aérea. Sin embargo, en la raíz, la acumulación fue se incrementó entre 2-3 veces en plantas compuestas *mt4a* cuando fueron expuestas a Cu. De esta forma, los mejores resultados en acumulación, fueron los obtenidos en plantas compuestas inoculadas con MA11-*CopAB*, apoyando la idea del uso de sistemas combinados de planta/microorganismos con objetivos de rizorremediación, ya que, mientras la planta transgénica mejora su tolerancia y crece en mejores condiciones debido a la expresión de *mt4a*, la inoculación con la bacteria MA11-*CopAB* mejora la acumulación de Cu en la raíz. Los factores de traslocación más bajos se consiguieron con el doble sistema transgénico, plantas que expresan *mt4a* y bacterias que expresan *copAB*. En este caso, la

planta acumula el metal en la raíz evitando su traslocación a la parte aérea. Es más, en los últimos años se han usado microorganismos resistentes a metales en biorremediación ya que estos poseen un alto potencial en alterar la movilidad y la biodisponibilidad del metal (Rajkumar y col., 2013).

Para confirmar que el sistema de plantas compuestas de *M. truncatula* es adecuado para la fitoestabilización y biorremediación de metales pesados, se eligió otro metaloide tóxico como el As y se crearon plantas compuestas que expresaban en este caso el factor de transcripción ERN y la nodulina temprana *ENOD12*. Las leguminosas acumulan As y otros metales preferiblemente en la raíz (Pajuelo y col., 2008, 2011; Reichman, 2007; El Aafi y col., 2012) y este hecho es muy adecuado para la fitoestabilización del metal (Vázquez y col., 2006; Dary y col., 2010; El Aafi y col., 2012) ya que éste se inmoviliza en la rizosfera de la planta sin producirse la translocación a los tallos (Méndez y Maier, 2008). La sobreexpresión de *ERN* se tradujo tanto en una mejora de la nodulación como en una disminución en el acortamiento de la raíz que se produce por la acción del As. Por el contrario, la sobreexpresión de *ENOD12* mejoró de forma muy marcada la nodulación en presencia de As (más de 10 veces), pero no tuvo ningún efecto en el crecimiento de la raíz. Con estos resultados podríamos considerar a *ERN* y *ENOD12* como candidatos aceptables para la mejora biotecnológica con el fin de mejorar la tolerancia y la nodulación bajo condiciones de estrés por As.

Por eso, en términos generales, este capítulo presenta el desarrollo de una nueva herramienta biotecnológica con la asociación planta/bacteria y todos los beneficios que ésta ofrece. En suelos contaminados con Cu, las plantas compuestas que expresan el gen *mt4a* mejoran su estado fisiológico y crecen en mejores condiciones, aumentando su nodulación. Además, la inoculación con la bacteria MA11-*CopAB* mejora la acumulación del metal y lo estabiliza en el suelo quedando éste menos biodisponible y evitando su entrada en la cadena trófica. Por otra parte, en suelos contaminados con As, la expresión de *ERN* en plantas compuestas reduce el estrés de la raíz y restaura parcialmente la nodulación en presencia de As sin verse afectada la longitud de la raíz. La sobreexpresión de *ENOD12* resulta en un incremento en la nodulación muy grande a cualquier exposición aunque no se produce tanto alivio del estrés como en el caso anterior. Por todo esto, los resultados obtenidos en este capítulo darán más fiabilidad a posibles estudios de campo donde las leguminosas son un cultivo habitual y apreciado.

CONCLUSIONS

1. Overexpression of the metallothionein gene *mt4a* in vegetative tissues of *A. thaliana* at different developmental stages improves metal tolerance, but lead to minor effects on metal accumulation.
2. Heterologous expression of *mt4a* gene in roots of composite plants of *M. truncatula* improves Cu tolerance and nodulation and decreases oxidative stress. Inoculation with a genetically modified *Sinorhizobium medicae* expressing bacterial copper resistance genes *copAB* from *Pseudomonas fluorescens* further enhances Cu phytostabilization into plant roots and nodules.
3. Transgenic hairy tobacco roots expressing the prokaryotic gene *copC* from *Pseudomonas fluorescens* are able to accumulate extreme Cu concentrations, up to 45,000 $\mu\text{g. g}^{-1}$. Subcellular targeting to vacuole is a good strategy to improve metal accumulation and to decrease oxidative stress.
4. The expression of the bacterial arsenic pump *arsB* in the cytoplasmic membrane of hairy roots does not significantly improve As accumulation, whereas its expression in the tonoplast leads to significant increases in As accumulation. Strategies such as phosphate deprivation or desiccation, which induce membrane transporters, allow As accumulation up to 10,000 $\mu\text{g. g}^{-1}$.
5. Concerning gene expression, transcriptomic analysis suggest that, in transgenic roots expressing ArsB in the plasma membrane, genes involved in the electron transport chain are highly overexpressed, whereas in those expressing AsrB in the tonoplast, the glutathione and phytochelatin synthesis pathway was particularly induced.
6. Metabolomic analysis
7. A new parameter to evaluate the oxidative stress has been proposed, which has been termed Oxidative Stress Index (OSI). The OSI is a global parameter of oxidative stress, calculated as a prorated average of several stress related magnitudes in relation to their value in the absence of stress.
8. The values of OSI indicate that the oxidative stress caused by As to hairy roots, particularly lipid peroxidation leading to membrane damage, is not alleviated by

expression of the *arsB* gene, neither in the plasma membrane nor particularly in the tonoplast.

BIBLIOGRAFÍA

Abate T., Alene A.D., Bergvinson D., Shiferaw B., Silim S., Orr A., Asfaw S. 2012. Tropical Grain Legumes in Africa and South Asia: Knowledge and Opportunities. SAT eJournal. 10: 1-12

Abercrombie J.M., Halfhill M.D., Ranjan P., Rao M.R., Saxton A. M., Yuan J. S., Stewart C.N. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. BMC Plant Biology. 8(1): 87

Adriaensen K., Vralstad T., Noben J.P., Vangronsveld J., Colpaert J.V. 2005. Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7279–7284

Aebi H., 1984. Catalase in vitro. Method. Enzymol. 105: 121–126

Ager F.J., Ynsa M.D., Dominguez-Solís J.R., Gotor C., Respaldiza M. A., Romero L.C. 2002. Cadmium localization and quantification in the plant *Arabidopsis thaliana* using micro-PIXE. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 189(1): 494-498

Agostini E., Coniglio M. S., Milrad S. R., Tigier H. A., Giuliotti A. M. 2003. Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. Biotechnology and Applied Biochemistry. 37: 139–144. doi: 10.1042/BA20020079

Ahamed S., Kumar Sengupta M., Mukherjee A., Amir Hossain M., Das B., Nayak B., Chakraborti D. 2006. Arsenic groundwater contamination and its health effects in the state of Uttar Pradesh (UP) in upper and middle Ganga plain, India: a severe danger. Science of the Total Environment. 370(2): 310-322

Ahsan N., Lee D.G., Alam I., Kim P.J., Lee J.J., Ahn Y-O., Kwak S.S., Lee I.J., Bahk K.Y., Renaut J., Komatsu S., Lee B.H. 2008. Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. Proteomics. 8: 3561–3576

Alastuey A., García-Sánchez A., López F., Querol X. 1999. Evolution of pyrite mud weathering and mobility of heavy metals in the Guadiamar valley after the Aznalcóllar spill, south-west Spain. Science of The Total Environment. 242 (1-3): 41-55

Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*. 231 (6). 1237-1249

Al-Whaibi M.H. 2011. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science*. 23(2): 139–150

Andrianov V., Borisjuk N., Pogrebnyak N., Brinker A., Dixon J., Spitsin S., Flynn J., Matyszczyk P., Andryszak K., Laurelli M., Golovkin M., Koprowski, H. 2010. Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnology Journal*. 8: 277–287

Arita A., Costa M. 2009. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics*. 1: 222-228

Arnesano F., Banci L., Bertini I., Mangani S., Thompsett A.R. 2003. A redox switch in CopC: An intriguing copper trafficking protein that binds copper (I) and copper (II) at different sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(7), 3814-3819

Astolfi E., Garcia Fernandez J.C., Maccagno A., Guerra C., Besuschio, S.C. 1982. Hidroarsenicismo crónico regional endémico. Hidroarsenicismo crónico regional endémico. Cooperativa General Belgrano.

ATSDR. 2007. Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA

Bačkor M., Loppi S. 2009. Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia Plantarum*. 53 (2): 214-222

Baker D.E., Senef J.P. 1995. Copper. Alloway BJ (ed), *Heavy metals in soils*: 179-205. Blackie Academic and Professional, London.

Bales B.C., Kodama T., Weledjil Y.N., Pitié M., Meunier B., Greenberg M.M. 2005. Mechanistic studies on DNA damage by minor groove binding copper–phenanthroline conjugates. *Nucleic Acids Research*. 33 (16): 5371-5379

Bandyopadhyay M., Jha S., Tepfer D. 2007. Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Reports*. 26 (5): 599-609

Bani A., Pavlova D., Echevarria G., Mullaj A., Reeves R.D., Morel J.L., Sulçe S. 2010. Nickel hyperaccumulation by the species of *Alyssum* and *Thlaspi* (Brassicaceae) from the ultramafic soils of the Balkans. *Bot. Serb.* 34: 3–14

Barabasz A., Krämer U., Hanikenne M., Rudzka J., Antosiewicz D.M. 2010. Metal accumulation in tobacco expressing *Arabidopsis halleri* metal hyperaccumulation gene depends on external supply. *Journal of Experimental Botany.* 61 (11): 3057-3067

Bauer P., Crespi M.D. Szécsi J., Allison L.A., Schultze M., Ratet P., Kondorosi E., Kondorosi A. 1994. Alfalfa *Enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol.* 105(2): 585–592.

Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie.* 316(10): 1194-1199

Begum S.A., Sahai M., Ray, A.B. 2010. Non-conventional lignans: coumarinlignans, flavonolignans, and stilbenolignans. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* 93:1-70). Springer Vienna

Benzie I. F., Szeto Y. T. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 47(2): 633-636

Bernal M., Ramiro M. V., Cases R., Picorel R., Yruela I. 2006. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiologia Plantarum,* 127: 312–325

Bienert G.P., Thorsen M., Schüssler M.D., Nilsson H.R., Wagner A., Tamás M. J., y Jahn T.P. 2008. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As (OH) 3 and Sb (OH) 3 across membranes. *Bmc Biology.* 6(1): 26

Bizily S.P., Rugh C.L., Summers A.O., Meagher R.B. 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96, 6808-6813

Bleeker P.M., Hakvoort H.W., Blik M., Souer E., Schat H. 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J.* 45: 917–929

Bobé P., Chelbi-Alix M.K. 2008. New therapeutic perspectives for arsenic: from acute promyelocytic leukemia to autoimmune diseases. 24(11):967-971

Boisson-Dernier A., Chabaud M., García F., Bécard G., Rosenberg C., Barker D.G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Mol Plant Microbe Interact. 14(6):695-700

Boominathan R., Doran P.M. 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. New Phytologist, 156: 205–215. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00506.x

Boominathan R., Doran P.M. 2003a. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. Biotechnol. Bioeng. 83: 158–167

Borne F.D., Elmazan T., Roton C., Hzs L., Tepfer M. 1998. Cadmium partitioning in transgenic tobacco plants expressing a mammalian metallothionein gene. Mol. Breeding. 4: 83–90

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Brown P.H., Cakmak I., Zhang Q. 1993. Form and Function of Zinc Plants. Zinc in Soils and Plants. Developments in Plant and Soil Sciences. 55: 93-106

Buchner J. 1999. Hsp90 & Co. – a holding for folding. – Trends Biochem. Sci. 24: 136-141

Burló F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A.A., Valero D., Martínez-Sánchez F. 1999. Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 1247–1253.

Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. J. Biol. Inorg. Chem. 114: 169-189

Cambrollé J., Redondo-Gómez S., Mateos-Naranjo E., Figueroa M.E. 2008. Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. Marine Pollution Bulletin. 56: 2037–2042

Cambrollé J., Mateos-Naranjo E., Redondo-Gomez S., Luque-Palomo, M.T., Figueroa M.E. 2011. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium Flavum Crantz*. Environ. Exp. Bot. 71: 57-64

Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B.P. 1995. The ars Operon of *Escherichia coli* Confers Arsenical and Antimonial Resistance. Journal of Bacteriology. 177 (4): 981–986

Cerri M.R., Frances L., Laloum T., Auriac M.C., Niebel A., Oldroyd G.E.D. Barker D.G. Fournier J., Carvalho-Niebel F. 2012. *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. Plant Physiology December. 160(4), 2155-2172

Chaney R.L. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. J.F.E.A. Parr (Ed.), Land Treatment of Hazardous Wastes, Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ. 50–76

Chappaz A., Lyons T. W., Gordon G. W., Anbar, A. D. 2012. Isotopic fingerprints of anthropogenic molybdenum in lake sediments. Environmental science & technology. 46(20): 10934-10940

Charlton A. 2004. Medicinal uses of tobacco in history. Journal of the Royal Society of Medicine. 97: 6292-296

Chehregani A., Malayeri B.E. 2007. Removal of heavy metals by native accumulator plants. Int. J. Agri. Biol. 9: 462–465

Chen B., Roos P., Zhu Y.G. Jakobsen I. 2008. Arbuscular mycorrhiza contribute to phytostabilization of uranium in uranium mining tailings. J Environ Radioact. 99 (5), 801-810

Chen J.Y., Wen P.F., Kong W.F., Pan Q.H., Zhan J.C., Li J.M., Wan S.B., Huang W.D. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. Postharvest Biology and Technology. 40(1): 64-72

Chen L.M., Lin C.C., Kao C.H. 2000. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 99-103

Chisholm J.E., Jones G.C., Purvis O.W. 1987. Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. Mineral. Mag. 51: 715-718

- Choudhury B., Mitra S., Biswas A. K. 2010. Regulation of sugar metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under arsenate toxicity and its improvement by phosphate. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 16(1): 59-68
- Chu T.C., Lee H.L., Gaynor J.J., Vega Q. C., Lustigman B.K., Srinivasan S. 2007. Identification of *Synechococcus* sp. IU 625 metallothionein gene and its evolutionary relationship to the metallothionein gene of other cyanobacteria. *Proceedings of the 2007 International Conference on Bioinformatics and Computational Biology*: 201-207.
- Clemens S., Palmgren M.G., Kramer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*. 7: 309-315
- Clijsters H., Van Assche F. 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*. 7 (1): 31-40
- Clough S.J., Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16: 735-743
- Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:159–82
- Colangelo E.P., Gueriot M.L. 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:322–330
- Collin V.C., Eymery F., Genty B., Rey P., Havaux M. 2008. Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 31(2):244-57
- Cosgrove D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6, 850-861
- Crane C., Wright E., Dixon R, A., Wang Z. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta*. 223: 1344–1354
- Dalala M., Tayal D., Chinnusamyb V., Bansal K. C. 2008. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 *LEA* from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology* 139: 137–145
- Daniell H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20, 581 – 586. doi:10.1038/nbt0602-581

Dary M., Chamber-Pérez M.A., Palomares A.J., Pajuelo E. 2010. 'In situ' phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* 177: 323–330

David K.M., Couch D., Braun N., Brown S., Grosclaude J., Perrot-Rechenmann, C. 2007. The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *The Plant Journal*, 50: 197–206

De Lorenzo L., Merchan F., Laporte P., Thompson R., Clarke J., Sousa C., Crespi M. 2009. A novel plant LRR receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. *Plant Cell*. 21: 668-680

De Pinto M. C., De Gara L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*. 55 (408):2559-2569

De Pinto M.C., Paradiso A., Leonetti P., De Gara L. 2006. Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal*. 48 (5): 784-795

De Zélicourt A., Diet A., Marion J., Laffont C., Ariel F., Moison M., Zahaf O., Crespi M., Gruber V.R., Frugier F. 2012. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant J*. 70: 220-230

Delgadillo J., Lafuente A., Doukkali B., Redondo-Gómez S., Mateos-Naranjo E., Caviedes M.A., Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D. 2014. Improving legume nodulation and Cu rhizostabilization using a genetically modified rhizobia. *Environmental Technology*. DOI: 10.1080/09593330.2014.983990

Delhaize E., Kataoka T., Hebb D.M., White R.G., Ryan, P.R. 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *The Plant Cell Online*. 15(5): 1131-1142

Dellaporta S, J Wood, and JB Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rept* 1:19–21

Dewanjee S., Gangopadhyay M., Das U., Sahu R., Samanta A., Banerjee P. 2014. Signal transducer and oxidative stress mediated modulation of phenylpropanoid

pathway to enhance rosmarinic acid biosynthesis in fungi elicited whole plant culture of *Solenostemon scutellarioides*. *Enzyme and Microbial Technology*. 66: 1-9

Dhankher O. P., Li Y., Rosen B. P., Shi J., Salt D., Senecoff J.F., Meagher R.B. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nature biotechnology*. 20(11): 1140-1145

Di Sansebastiano G.P., Paris N., Marc-Martin S., Neuhaus J.M. 2001. Regeneration of a lytic central vacuole and of neutral peripheral vacuoles can be visualized by green fluorescent proteins targeted to either type of vacuoles. *Plant Physiol*. 126, 78–86

Dixit P., Mukherjee P. K., Ramachandran V., Eapen S. 2011. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS ONE*. 6 (1)

Dixon D.P., Edwards R. 2010. Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book*. 8 The American Society of Plant Biologists, Austin, Tex, USA, 2010.

Dixon R.A., Paiva N.L. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism *The Plant Cell*, Vol. 7, 1085-1097

Doran P.M. 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnol. Bioeng*. 103, 60–76

Doty S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*. 179: 318–333

Drażkiewicz M., Skórzyńska-Polit E., Krupa Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals*. 17: 379–387

Du Y.Y., Wang P.C., Chen J., Song, C.P. 2008. Comprehensive Functional Analysis of the Catalase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 1318–1326

Duan G.L., Hu Y., Liu W. J., Kneer R., Zhao F.J., Zhu Y.G. 2011. Evidence for a role of phytochelatins in regulating arsenic accumulation in rice grain. *Environmental and Experimental Botany*, 71(3), 416-421

Duman F., Ozturk F., Aydin Z. 2010. Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As (III) and As(V): effects of concentration and duration of exposure. *Ecotoxicology* 19, 983–993

Duquesnoy I., Goupil P., Nadaud I., Branlard G., Piquet-Pissaloux A., Ledoigt G. 2009. Identification of *Agrostistenuis* leaf proteins in response to As (V) and As (III) induced stress using a proteomics approach. *PlantSci.* 176, 206–213

Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H., Raskin I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.* 29 (5): 1239–1245

Eapen S., Suseelan K.N., Tivarekar S., Kotwal S.A., Mitra, R. 2003. Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ. Res.* 91: 127–133

Eapen S., D'Souza S.F. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances.* 23 (2): 97-114

Ebbs S.D., Lasat M.M., Brady D.J., Cornish J., Gordon R., Kochian L.V. 1997. Phytoextraction of Cadmium and Zinc from a Contaminated Soil. *Journal of Environmental Quality.* 26(5): 1424-1430

El Aafi N., Brhada F., Dary M., Filali-Maltouf A., Pajuelo E. 2012. Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC541. *International Journal of Phytoremediation* 14: 261–274

Ellis D.R., Gumaelius L., Indriolo E., Pickering I.J., Banks J.A., Salt D.E. 2006. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant physiology.* 141(4): 1544-1554

Evans K.M., Gatehouse J.A., Lindsay W.P., Shi J., Tommey A.M. Robinson N.J. 1992. Expression of the pea metallothionein-like gene PsMT A in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: Implications for PsMT A function. *Plant Molecular Biology.* 20 (6): 1019-1028

Fageria N.K., Baligar V.C., Clark R.B. 2002. Micronutrients in Crop Production. *Advances in Agronomy.* 77, 185-268

Fahraeus, G. 1957. The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *J. gen. Microbiol.* 16: 374-381

Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M.H., Lin Y.H., Reid D.E., Gresshoff P. M. 2010. Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology.* 52 (1): 61–76

Festa R.A., Thiele D.J. 2011. Copper: an essential metal in biology. *Current Biology.* 21(21): 877-883.

Finnegan P.M. y Chen W. 2012. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front Physiol.* 3: 182

Flocco C.G., Giulietti A.M. 2006. In vitro hairy root cultures as a tool for phytoremediation research. *Phytoremediation: Methods and Reviews.* 23, 161-173

Foyer C. H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* 17(7): 1866–1875

Friedl G., Wüest, A. 2002 Disrupting biogeochemical cycles - Consequences of damming. *Aquatic Sciences,* 64, 55–65

Frigerio L., Hinz G., Robinson D.G. 2008. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic* 9, 1564-1570.

Fu S.F., Chen P.Y., Nguyen T.T., Huang L.Y., Zeng G.R., Huang T.L., Huang H. J. 2014. Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in *Arabidopsis*. *BMC plant biology.* 14(1): 94

Fusco N., Micheletto L., Dal Corso G., Borgato L., Furini A. 2005. Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *Journal of Experimental Botany.* 56 (421): 3017– 3027

Galanis A., Karapetsas A., Sandaltzopoulos R. 2009. Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signaling. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis-* 674 (1-2): 31-35

García J., Barker D.G., Journet P.2006. Seed storage and germination . *Medicago truncatula* handbook

García-Limones C., Hervás A., Navas-Cortés J.A., Jiménez-Díaz R.M., Tena M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and molecular plant pathology*. 61(6): 325-337

García-Salgado S., Garcia-Casillas D., Quijano-Nieto M.A., Bonilla-Simon M.M. Arsenic and heavy metal uptake and accumulation in native plant species from soils polluted by mining activities. *Water Air Soil Pollut*. 223: 559–572

Gargouri B., Karray F., Mhiri N., Aloui F., Sayadi S. 2001. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 189 (1-2): 427-434

Gattolin S., Sorieul M., Frigerio L. 2010. Tonoplast intrinsic proteins and vacuolar identity. *Biochemical Society Transactions*.38 (3): 769-773

Gene Ontology Consortium. 2004. "The Gene Ontology (GO) database and informatics resource." *Nucleic acids research*. 32(1): D258-D261

Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J. 2012. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol*. 30 (10): 528-537

Ghosh M., Singh S.P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Appl. Ecol. Environ. Res*. 3(1): 1-18

Gill S.S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48 (12). 909-930

Giri A., Narasu L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18:1–22

Giusti L. 2009. A review of waste management practices and their impact on human health. *Waste Management*. 29 (8): 2227-2239

Górecka K., Cvikrová M., Kowalska U., Eder J., Szafrńska K., Górecki R., Janas K. M. 2007. The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45(1): 54-61

Goupil P., Souguir D., Ferjani E., Faure O., Hitmi A., Ledoigt G. 2009. Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. 166(13): 1446–1452

Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 388: 151–157

Gramham P.H., Vance C.P. 2003. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131: 872-877

Grill E., Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D. 2007. Role of Phytochelatins in Phytoremediation of Heavy Metals. *Environmental Bioremediation Technologies*. 101-146

Groppa M.D., Benavides M.P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. 34 (1): 35-45

Guerinot M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1465 (1–2):190–198

Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P. K., Rideau M., Gantet P. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current opinion in plant biology*. 9(3): 341-346

Guo W.J., Meenam M., Goldsbrough P.B. 2008. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant. Physiol.* 146: 1697-1706

Gupta K., Ghosh U.C. 2009. Arsenic removal using hydrous nanostructure iron (III)–titanium (IV) binary mixed oxide from aqueous solution. *Journal of hazardous materials*. 161(2): 884-892

Gupta D.K., Srivastava S., Huang H.G., Romero-Puertas M.C., Sandalio L.M. 2011. Arsenic Tolerance and Detoxification Mechanisms in Plants. *Detoxification of Heavy Metals. Soil Biology*.30:169-179

Gupta D.K., Corpas F. J., Palma J. M. (Eds.) 2013. Heavy Metals as Essential Nutrients. *Heavy Metal Stress in Plants*: 271-294. Rengel Z. 2004. . ISBN 978-3-642-38469-1

Häkkinen S.T., Tilleman S., Swiatek A., De Sutter V., Rischer H., Vanhoutte I., Van Onckelen H., Hilson P., Inzé D., Oksman-Caldentey K.M., Goossens A. 2007. Functional characterisation of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. *Phytochemistry*. 68(22-24), 2773-85

Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1-11

Han Y., Sa G., Sun J., Shen Z., Zhao R., Ding M., Chen, S. 2014. Overexpression of *Populus euphratica* xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene confers enhanced cadmium tolerance by the restriction of root cadmium uptake in transgenic tobacco. *Environmental and Experimental Botany*. 100: 74-83

Harrison S.J., Mott E.K., Parsley K., Aspinall S., Gray J.C., Cottage A. 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation, *Plant Methods*. 2:19

Hasegawa I., Terada E., Sunairi M., Wakita H., Shinmachi F., Noguchi A. 1997. Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUPI*). *Plant Soil*. 196: 277–281

Hassinen V. H., Tervahauta A. I., Schat H., Kärenlampi S.O. 2011. Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity?. *Plant Biology*, 13: 225–232. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x

Hattori J., Labbé H., Miki B.L. 1994. Construction and expression of a metallothionein- β -glucuronidase gene fusion. *Genome*. 37(3): 508-512, 10.1139/g94-071

Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal Behav.* 7 (11): 1456-1466.

Helling D., Possart A., Cottier S., Klahre U., Kost B. 2006. Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling. *The Plant Cell*. 18(12): 3519-3534

Henkel G., Krebs G. 2004. Metallothioneins: Zinc, Cadmium, Mercury, and Copper Thiolates and Selenolates Mimicking Protein Active Site Features Structural Aspects and Biological Implications. *Chem. Rev.* 104: 801-824

Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F.V., Munné-Bosh S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in Plants Science*. 14 (3):125-132

Hirai M.Y., Fujiwara T., Awazuhara M., Kimura T., Noji M., Saito K. 2003. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the role of *O*-acetyl-l-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal*, 33: 651–663. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01658.x

Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179 – 180

Hood E.E., Gelvin S.B, Melcehers L.S., Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants, *Transgenic Res*. 2: 208-218

Hossain M.A., Piyatida P., Teixeira da Silva J., Fujita M. 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*. doi:10.1155/2012/872875

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60-c6.pdf>

Huang T.L., Nguyen Q.T., Fu S.F., Lin C.Y., Chen Y.C., Huang H.J. 2012. Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots. *Plant Mol Biol*. 80(6):587-608

Hughes M. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*. 133(1): 1–16.

Hussein H., Ruiz O.N., Terry N., Daniell H. 2007. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: Enhanced root uptake, translocation to shoots and volatilization. *Environ. Sci. Technol*. 41: 8439–8446

Ike A., Sriprang R., Ono H., Murooka Y., Yamashita M. 2007. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the *MTL4* and the *PCS* genes. *Chemosphere*. 66 (9): 1670-1676

Ireland H. E., Harding S. J., Bonwick G.A., Jones M., Smith C.J., Williams J. H. H. 2004. “Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*,” *Biomarkers*. 9(2): 139–155

Isayenkov S. V., y Maathuis F.J. 2008. The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7; 1 is a pathway for arsenite uptake. *Febs Letters*. 582(11): 1625-1628

Jauh G.Y., Phillips T. E., Rogers J. C. 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *The Plant Cell Online*. 11(10): 1867-1882

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M. W. 1987. GUS fusions: *B-glucuronidase* as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*. 6 (13):3901 -3907

Jiang L., Rogers J.C. 1998. Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J. Cell Biol.*, 143(5):1183-1199

Karenlampi S., Schat H., Vangronsveld J., Verkleij J.A.C., Van der Lelie D., Mergeay M., Tervahauta A.L. 2000. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution*.107: 225–231

Karthikeyan A.S., Varadarajan D.K., Mukatira U.T., D’Urzo M.P., Damsz B., Raghothama K.G. 2002. Regulated Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters. *Plant Physiology*. 130(1): 221-233

Kawashima I., Kennedy T.D. Chino M. Lane B.G. 1992. Wheat Ec metallothionein genes. Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur. J. Biochem*. 209: 971-976

Kawashima I., Kennedy T.D., Chino M., Lane B.G. 1992. Wheat Ec metallothionein genes. *Eur. J. Biochem*. 209: 971-976

Kerkeb L., Krämer U. 2003. The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*. 131(2): 716-724

Khan I., Ahmad A., Iqbal M. 2009. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 626–634

Kitamura K., Hoshi S., Koike M., Kiyoi H., Saito Naoe T. 2011. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic trioxide differentiates acute promyelocytic leukaemia cells with t(11;17) in combination with all-*trans*retinoic acid. *British Journal of Haematology*. 108 (4): 696-702

Kobae Y., Uemura T., Sato M.H., Ohnishi M., Mimura T., Nakagawa T., Maeshima M. 2004. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar

membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant and Cell Physiology*. 45(12): 1749-1758

Koornneef M., Meinke D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*. 61, 909–921

Kopittke P.M., Dart P.J., Menzies N.W. 2007. Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Pollut.* 145(1): 309-315

Kopriva S., Koprivova A. 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J. Exp. Bot.* 55: 1775–1783

Korkina L.G. 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology*. 53(1): 15-25

Kováčik J., Grúz J., Backor M., Tomko J., Strnad M., Repcak M. 2008. Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environmental and Experimental Botany*. 62, 145–152

Krämer U., Chardonens A. 2001. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55(6): 661-672

Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J. 2004. Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17 (1), 6-15.

Küpper H., Gotz B., Mijovilovich A., Küpper F.C., Meyer-Klaucke W. 2009. Complexation and toxicity of copper in higher plants. I. Characterization of copper accumulation, speciation and toxicity in *Crassula helmsii* as a new copper accumulator. *Plant Physiol.* 151 (2): 702-714

Lafuente A., Pajuelo E., Caviedes M.A., Rodriguez-Llorente I.D. 2010. Reduced nodulation in alfalfa induced by arsenic correlates with altered expression of early nodulins. *Journal of Plant Physiology*. 167 (4): 286-291

Lane B., Kajioka R., Kennedy T. 1987. The wheat-germ E_c protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology*. 65(11): 1001-1005

Lee J., Bae H., Jeong J., Lee J.Y., Yang Y.Y., Hwang I., Martionioia E., Lee Y. 2003. Functional Expression of a Bacterial Heavy Metal Transporter in *Arabidopsis* Enhances

Resistance to and Decreases Uptake of Heavy Metals. *Plant Physiology*. 133 (2): 589-596

Lee M., Yang, M. 2010. Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. vulgaris) to remediate uranium contaminated groundwater. *J. Hazard. Mater.* 173: 589-596

Lee Y.P., Kim S.H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S., Kwon S.Y. 2007. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant cell reports*. 26 (5): 591-598

Li W., Khan M.A., Yamaguchi S., Kamiya Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seed growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 46:45-50

Li Y.M., Chaney R., Brewer E., Roseberg R., Angle J.S., Baker A., Reeves R., Nelkin J. 2003. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant Soil*, 249:107–115

Liang H.M., Lin T.H., Chiouc J.M., Yeh K.C. 2009. Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. *Environmental Pollution*. 157 (6). 1945-1952.

Liang X., Zhang L., Natarajan S. K., Becker D. F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*. 19(9): 998-1011

Liu Z.J., Boles E., Rosen B.P. 2004. Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279: 17312–17318

Lokhande V.H., Srivastava S., Patade V., Dwivedi S., Tripathi R.D., Nikam T.D., Suprasanna P. 2011. Investigation of arsenic accumulation and tolerance potential of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Chemosphere*. 83: 529-534

Lombi E., Zhao F.J, Dunham S.J., McGrath S.P. 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemical enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30:1919–1926

Lone M.I., He Z.L., Stofella P.J., Yang X. 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ. Sci. B.* 9(3): 210-220

Ma C.Y., Liu W.K., Che C. T. 2002. Lignanamides and Nonalkaloidal Components of *Hyoscyamus niger* Seeds. *Journal of natural products*. 65(2): 206-209

Ma J. F., Yamaji N., Mitani N., Xu X. Y., Su Y. H., McGrath S. P., Zhao F. J. 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*105, 9931–9935

Macek T., Kotbra P., Suchova M., Skacel F., Demnerova K., Ruml T. 1994. Accumulation of cadmium by hairy-root cultures of *Solanum nigrum*. *Biotechnol. Lett.* 16: 621–624

Maiti I.B., Wagner G.J., Yeagan R., Hunt A.G. 1989. Inheritance and expression of the mouse metallothionein gene in tobacco. *Plant Physiol.* 91: 1020–1024

Margui, E., Queralt, I., Cravalho, M.L., Hidalgo, M. 2005. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for elements determination in plant specimens from abandoned mining area. *Anal. Chim. Acta*, 549, 197-204

Marques I. A., Anderson L. E. 1986. Effects of arsenite, sulfite, and sulfate on photosynthetic carbon metabolism in isolated pea (*Pisum sativum* L., cv Little Marvel) chloroplasts. *Plant Physiol.*82: 488–493

Mascher R., Lippmann B., Holzinger S., Bergmann. 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*. 163 (5):961-969

Mateos-Naranjo E., Redondo-Gomez S., Cambrollé J., Figueroa M.E. 2008. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environ. Res.* 66(4): 459-465

Medina-Bolivar F., Condori J., Rimando A. M., Hubstenberger J., Shelton K., O’Keefe, S. F., Dolan M. C. 2007. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*. 68(14): 1992-2003

Mediouni C., Ben Ammar W., Houlné G., Chabouté M.E., Jemal F. 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regul.* 57: 89–99

Meharg A. A., Hartley-Whitaker J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*. 154(1): 29-43

Meharg A. A., Macnair M. R. 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*. 43(4): 519-524

Meharg A.A, Naylor J., Macnair M.R. 1994. Phosphorus nutrition of arsenate tolerant and non tolerant phenotypes of velvet grass. *Journal of Environmental Quality* 23: 234–238.

Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*. 282: 662-682

Mejaré M., Bülow L. 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology*. 19 (2): 67-73

Mello-Farias P.C., Chaves A.L.S. 2008. Biochemical and molecular aspects of toxic metals phytoremediation using transgenic plants. In: *Transgenic Approach in Plant Biochemistry and Physiology*, Tiznado-Hernandez, M.E.; Troncoso-Rojas, R. & Rivera-Domínguez, M. A. (Ed.) 253-266, Research Signpost, Kerala, India.

Méndez M.O., Maier R.M. 2008. Phytostabilisation of mine tailings in arid and semiarid environments: an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 116: 278–283

Merchan, F., de Lorenzo, L., Rizzo, S.G., Niebel, A., Manyani, H., Frugier, F., Sousa, C. and Crespi, M. 2007. Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 51, 1–17

Mesjasz-Przybyłowicz J., Nakonieczny M., Migula P., Augustyniak M., Tarnawska M., Reimold W.U., Koeberl C., Przybyłowicz W., Glowacka E. 2004. Uptake of cadmium, lead, nickel and zinc from soil and water solutions by the nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 46: 75–85

Meyerowitz, E.M. 1989. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*, 56, 263–269

Michalak A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J. of Environ. Stud.* 15(4): 523-530

Milner M.J., Kochian L.V. 2008. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Ann. Bot.* 102 (1): 3-13

- Mimura T. 1999. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology – a Survey of Cell Biology* 191:149–200
- Misra S., Gedamu L. 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor. Appl. Genet.* 78:161–168
- Mittler R. 2002. Oxidative stresses, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410
- Mleczek M., Piechalak A., Tomaszewska B., Drzewiecka K., Nuc P. 2013. Plant-Based Remediation Processes. *Metal/Metalloid Phytoremediation: Ideas and Future. Soil Biology.* 35: 39-58
- Møller I.M., Kristensen B.K. 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Sciences.* 3 (8): 730–735
- Monferrán, M. V., Wunderlin, D. A. 2013. Biochemistry of Metals/Metalloids Toward Remediation Process. In *Heavy Metal Stress in Plants* (43-71). Springer Berlin Heidelberg.
- Mukherjee A., Sengupta M.K., Hossain A., Ahamed S., Das B., Nayak B., Lodh D., Mahmudur M., Chakraborti D. 2006. Arsenic Contamination in Groundwater: A Global Perspective with Emphasis on the Asian Scenario *J HEALTH POPUL NUTR* 24(2):142-163
- Mukhopadhyay S., Maiti S.K. 2010. Phytoremediation of metal enriched mine waste: a review. *Global J. Environ. Res.* 4: 135–150
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497
- Murillo M., Benzo Z., Marcano E., Gomez C., Garaboto A., Marin, C. 1999. Determination of copper, iron and nickel in edible oils using emulsified solutions by ICP-AES. *J. Anal. Atom. Spectr.* 14: 815-820
- Murphy A., Taiz L. 1995. Comparison of metallothioneins gene-expression and non-protein thiols in 10 *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol.* 109: 945-954
- Mylona P.V., Polidoros A.N., Scandalios, J.G., 1998. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radical Biol. Med.* 25, 576–585

- Naees M., Ali Q., Shahbaz M., Ali F. 2011. Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals: an overview. *Int. Res. J. Plant Sci.* 2: 220–232
- Nedelkoska T.V., Doran P.M. 2000. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 67:607–615
- Nedelkoska T.V., Doran P.M. 2000b. Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Engineer.* 13(5): 549-561
- Neumann D., Nieden U.Z., Lichtenberger O., Leopold I. 1995. How does *Armeria maritime* tolerate high heavy metal concentrations? *J Plant Physiol* 146, 704–717
- Nordstrom K. 2002. Worldwide occurrences of arsenic in groundwater. *Science* 296:2143–2145.
- Norkus E., Vaiciuniene J., Virbalyte D. 2002. Interaction of copper (II) with cellulose pulp. *Chemija (Vilnius)*. 13(2): 75-84
- Norton G.J., Lou-Hing D.E., Meharg A.A., Price A.H. 2008. Rice-arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis. *J. Exp. Bot.* 59:2267–76
- Okubo-Kurihara E., Sano T., Higaki T., Kutsuna N., Hasezawa S. 2009. Acceleration of vacuolar regeneration and cell growth by overexpression of an aquaporin NtTIP1; 1 in tobacco BY-2 cells. *Plant and cell physiology.* 50(1): 151-160
- Oldroyd G.E., Downie J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59:519-46
- Olvera-Carrillo Y., Campos F., Reyes J.L. Garcíarrubio A., Covarrubias A. 2010. Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 154: 373–390
- Oremland R.S., Stoloz J.F. 2003. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology.* 13 (2): 45-49
- Oremland R.S., Stolz J.F. 2003. The Ecology of Arsenic. *Science.* 300(5621): 939-944

- Padmavathiamma P.K., Li L.Y. 2007. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut.* 184. 105–126
- Pajuelo E., Rodríguez Llorente I.D., Dary M., Palomares A.J. 2008. Toxic Effects of Arsenic on *Sinorhizobium-Medicago Sativa* Symbiotic Interaction. *Environmental pollution.* 154 (2), 203-211
- Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D., Lafuente A., Pérez-Palacios P., Doukkali B., Caviedes M. A. 2014. Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an overview. *CAB Reviews* 2014 9, No. 001
- Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D., Lafuente A., Caviedes M.A. 2011. Legume–*Rhizobium* symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. In: Khan MS, Zaidi A, Goel R, Musarrat J, eds. *Biomangement of metal contaminated soils.* Environmental Pollution, vol. 20. Heidelberg, Germany: Springer, 95–123
- Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D., Lafuente A., Caviedes M.A. 2011. Legume-Rhizobium Symbioses As Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. Vol. 20. Pag. 95-123. En: *Biomangement of Metal -Contaminated Soils.* Ed. 1. Alemania. Springer. ISBN 978-94-007-1913-2
- Pan A., Tie F., Duau Z., Yang M., Wang Z., Li., L., Chen Z., Ru.B. 1994a. A-domain of human liver metallothionein I-A can bind to metals in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics.* 242 (6): 666-674
- Pan A., Yang M., Tie F., Li L., Chen Z., Ru B. 1994b. Expression of mouse metallothionein-1-gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 24: 341–351
- Panda S.K., Chaudhury I., Khan M.H. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum.* 46(2): 289-294
- Panda S.K. 2008. Impact of copper on reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidants in *Lemna minor*. *Biol. Plant.* 52, 561-564
- Paris N., Stanley C.M., Jones R.L, Rogers J.C. 1996. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell.* 85: 563-572
- Park S., Jeong W.Y., Lee J.H., Kim Y-H., Jeong S.W., Kim G-S., Bae D.W., Lim C-S., Jin J.S., Lee S.J., Shin S.C. 2012. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose

(*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 130 (4): 981-985

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24:255-265

Pawlik-Slowronuska B., Purvis O.W., Pirszel J., Skowronuski T. 2006. Cellular mechanisms of Cu-tolerance in the epilithic lichen *Lecanora polytropa* growing at a copper mine. *The Lichenologist*. 38(3): 267–275

Peñarrubia L., Andrés-Colás N., Moreno J., Puig S. 2010. Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator. *J. Biol. Inorg. Chem.* , 15 (1), 29–36

Peralta-Videa J. R., De la Rosa G., Gonzalez J. H., J. L. Gardea-Torresdey. 2004. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Adv. Environ. Res.* 8, 679–685

Persans M.W., Nieman K., Salt D.E. 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(17): 9995-10000

Pfaffl M. W. 2006. Relative quantification. *Real-time PCR*, 63-82

Picard D. 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1640–1648

Pickering I.J., Prince R.C., George M.J., Smith R.D., George G.N., Salt D.E. 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiology*. 122(4): 1171-1178

Pilon-Smits E., Pilon M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical reviews in plant sciences* 21 (5), 439-456

Pilon-Smith E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39

Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitão M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39: 1008–1018

Posmyk M. M., Kontek R., Janas K. M. 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72, 596–602

Pradhan S., Singh S., Rai L. C. 2007. Characterization of various functional groups present in the capsule of *Microcystis* and study of their role in biosorption of Fe, Ni and Cr. *Bioresource technology*. 98(3): 595-601

Prasad M.N.V., Freitas H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron. J. Biotechnol.* 6(3)

Puig S., Andrés-colás N., García-molina A., Peñarrubia L. 2007. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment*, 30: 271–290

Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., De Felipe M.R., Harrison J., Vanacker H., Foyer C.H. 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165, 683–701

Purvis O.W. 1984. The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide - bearing rocks in Scandinavia. *The Lichenologist*. 16: 197-204

Qin D., Wang F., Geng X., Zhang L., Yao Y., Ni Z., Peng H., Sun Q. Overexpression of heat stress-responsive TaMBF1c, a wheat (*Triticum aestivum* L.) Multiprotein Bridging Factor, confers heat tolerance in both yeast and rice. *Plant Mol Biol.* 87(1-2):31-45

Quagliariello E., Slater E.C., Palmieri F., Saccone C., Kroon A.M. 1985. *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*. Elsevier, Amsterdam, Vols 1 and 2.

Quandt H. J., Puehler A. L. F. R. E. D., Broer I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*. 6(6): 699-706

Rai P.K. 2008. Phytoremediation of Hg and Cd from industrial effluents using an aquatic free floating macrophyte *Azolla pinnata*. *Int. J. Phytorem.* 10: 430–439

Rai R., Pandey S., Shrivastava A.K., Pandey Rai S. 2014. Enhanced Photosynthesis and Carbon Metabolism Favor Arsenic Tolerance in *Artemisia annua*, a Medicinal Plant as Revealed by Homology-Based Proteomics. *International journal of proteomics*

Rajkumar M., Mab Y., Freitas H. 2013. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *Journal of Environmental Management*. 128, 973-980

Rama-Devi S., Prasad M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci*. 138(2): 157–165

Ramamurthy A.S., Memarian R. 2012. Phytoremediation of mixed soil contaminants. *Water Air Soil Pollut*. 223: 511–518

Raven K.P., Jain A., Loppert R.H. 1998. Arsenite and Arsenate Adsorption on Ferrihydrite: Kinetics, Equilibrium, and Adsorption Envelopes. *Environ. Sci. Technol*. 32, 344-349

Reichman S.M. 2007. The potential use of the legume–*rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*. 39 (10): 2587-2593

Rifat H., Safdar A., Ummay A., Rabia K., Iftikhar. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60 (4), 579-598

Rivetta A., Negrini N., Cocucci M. 1997. Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant, Cell and Environment*. 20(5): 600–608

Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J. 1993. Plant metallothioneins. *Biochem. J*. 295:1–10

Rodríguez-Llorente I.D., Lafuente A., Doukkali B., Caviedes M.A., Pajuelo E. 2012. Engineering copper hyperaccumulation in plants by expressing a prokaryotic *copC* gene. *Environ. Sci. Technol*. 46 (21). 12088-12097

Rodríguez-Llorente I.D., Perez-Palacios P., Doukkali B., Caviedes M.A., Pajuelo E. 2010. Expression of the seed-specific metallothionein *mt4a* in plant vegetative tissues increases Cu and Zn tolerance. *Plant Science*. 178: 327-332

Rodríguez-Llorente I.D., Perez-Palacios P., Doukkali B., Caviedes M.A., Pajuelo E. 2010. Expression of the seed-specific metallothionein *mt4a* in plant vegetative tissues increases Cu and Zn tolerance. *Plant Science*. 178: 327-332

Rogers J.P., 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell*, 11(10):1867-1882

Romeis T., Ludwig A.A., Martin R., Jones J.D. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo J.* 20 (20), 5556-5567

Roosens N.H., Bernard C., Leplae R., verbruggen N. 2004. Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Febs letters.* 577 (1-2): 9-16

Rose R.J., 2008. *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Funct Plant Biol* 35, 253-264

Rosen B. P., Borbolla M. G. 1984. A plasmid-encoded arsenite pump produces resistance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*124:760–765

Sagardoy R., Morales F., López-Millán A.F., Abadía A., Abadía J. 2009. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol.*11: 339-350

Sakakibara M., Ohmori Y., Ha N.T.H., Sano S., Sera K. 2011. Phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. *Clean: Soil, Air, Water.* 39. 735–741

Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S.C., Yamasaki H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67–80

Salnikow K., Zhitkovich A. 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem. Res. Toxicol.* 21: 28–44

Sarry J. E., Kuhn L., Ducruix C. 2006. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics.* 6(7): 2180–2198

Saxena K., Kumar R., Sultana R. 2010. Quality nutrition through pigeonpea—a review. *Health.* 2: 1335-1344

Scheidt H., Pampel A., Nissler L., Gebhardt R., Huster D. 2004. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1663 (1-2): 97-107

Scheres B., Van De Wiel C., Zalansky A., Hovath B., Spaink H., Eck H.V, Zwartkruis F., Wolters A.M. Gloudemans T., Kammen A.V. Bisseling T. 1990. The *ENOD12* Gene Product Is Involved in the Infection Process during the *Pea-Rhizobium* Interaction. *Cell*. 60, 281-294

Serraj R., Adu-Gyamfi J. 2004. Role of symbiotic nitrogen fixation in the improvement of legume productivity under stressed environments. *West Afr. J. Appl. Ecol.* 6:95–109

Sgherri E. C., Cosi F., Navari-Izzo. 2003. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess, *Physiol. Plant.* 118: 21-28

Shabani N., Sayadi M.H. 2012. Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. *Environmentalist*. 32. 91–98

Shangari N., O'Brien P.J. 2004. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 68: 1433-1442.

Sharma H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*. 4 (2): 118-138

Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. doi:10.1155/2012/217037

Sharma R.K., Agrawal M. 2005. Biological effects of heavy metals: an overview. *J Environ Biol.* 26(2 Suppl):301-313

Sharma S., Dietz K.J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14(1): 43-50

Shin H., Shin H.S., Dewbre G.R., Harrison M.J. 2004. Phosphate transport in *Arabidopsis*: *Pht1; 1* and *Pht1; 4* play a major role in phosphate acquisition from both low-and high-phosphate environments. *The Plant Journal*. 39(4): 629-642

Shri M., Kumar S., Chakrabarty D., Trivedi K.P., Mallick S., Misra P., Shukla D., Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Tuli R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1102–1110

Shu M.C., Choi D., Liu J.R. 1998. Cadmium resistance in transgenic tobacco plants expressing the *Nicotiana glutinosa* L. metallothionein-like gene. *Mol. Cells*. 8: 678–684

Shyu Y.S., Hwang L.S. 2002. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Research International*. 35(4): 357-365

Sigel A., Sigel H., Sigel R.O.K. 2009. *Metallothioneins and Related Chelators: Metal Ions in Life Sciences*. ISBN: 978-1-84755-899-2. DOI:10.1039/9781847559531

Singh H.P., Batish H., Kohli R.K., Arora K. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*. 53 (1): 65-73

Singla-Pareek S. L., Yadav S. K., Pareek A., Reddy M. K., Sopory S. K. 2006. Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiology*. 140(2): 613–623

Siripornadulsil S., Traina S., Verma D. P. S., Sayre R. T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell*. 14 (11): 2837–2847

Smirnoff N. 2005. Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions, in *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (ed N. Smirnoff), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470988565.ch3

Smith E. y col. 2003. Arsenic in Australian environment: an overview. *J. of Environ. Sci. and Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 38:223-239

Smyth G.K., Speed T. 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods*. 31 (4): 265–273

Song J., Zhao F.J., Luo Y.M., McGrath S.P., Zhang H. 2004. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 128: 307–315

Song W. Y., Park J., Mendoza-Cózatl D. G., Suter-Grotemeyer M., Shim D., Hortensteiner S., Geisler M., Weder B., Rea P. A., Rentsch D., Schroeder J. I., Lee Y., Martinoia E. 2010. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21187–21192

Sosa Alderete L., Talano M., Ibáñez S., Purro S., Agostini E., Milrad S., Medina M2009. Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *Journal of Biotechnology* 139: 273–279

Sparkes I.A., Runions J., Kearns A., Hawes C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* 1 (4), 2019-2025

Sprent J.I., James E.K. 2008. Legume–rhizobial symbiosis: an anorexic model?. *New Phytologist.* 179: 3–5

Sriprang R., Hayashi M., Yamashita M., Ono H., Saeki K., Murooka Y. 2002. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J. Biotechnol.* 99(3):279-93

Srivastava M., Ma L.Q., Santos J.A.G. 2006. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Sci. Total Environ.* 364: 24–31

Srivastava S., Mishra S., Tripathi R. D., Dwivedi S., Gupta D. K. 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquatic Toxicol.* 80, 405–515

Srivastava S., Mishra S., Tripathi R. D., Dwivedi S., Trivedi P. K., Tandon P. K. 2007. Phytochelatin and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Environmental science & technology.* 41(8): 2930-2936

Srivastava S., Srivastava A. K., Suprasanna P., D'souza S.F. 2009. Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. *Journal of experimental botany.* 60(12): 3419-3431

Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. 2001. "REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms". *PLoS ONE.* doi:10.1371/journal.pone.0021800

Szábados L., Savoure A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15 (2). 89-97

Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G. 2012. The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 4458-4483. doi:10.3390/ijms13044458

Tadege M., Wang T.L., Wen J., Ratet P., Mysore K.S. 2009. Mutagenesis and Beyond! Tools for Understanding Legume Biology. *Plant Physiol.* 151(3): 978–984

Talano M.A., Frontera S., González P., Medina M.I., Agostini E. 2010. Removal of 2, 4-dichlorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *J. Hazard. Mater.* 176: 784–791

Tangahu B.V., Abdullah S.R.S., Basri H., Idris M., Anuar N., Mukhlisin M. 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.*

Tepfer D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell.* 37 (3), 959–967

Thomas D.J., Li J., Waters S.B., Xing W., Adair B.M., Drobna Z., Devesa V., Styblo M. 2007. Arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase and methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.*, 232 : 3–13

Thomas J.C., Davies E.C., Malick F.K., Endreszl C., Williams C.R., Abbas M., Petrella S., Swisher K., Perron M., Edwards R., Ostenskowski P., Urbanczyk N., Wiesend W.N., Murray, K.S. 2003. Yeast Metallothionein in Transgenic Tobacco Promotes Copper Uptake from Contaminated Soils. *Biotechnol Progress.* 19: 273–280. doi: 10.1021/bp025623q

Tommey A.M., Shi j., Lindsay W.P., Urwin P.E., Robinson N.J. 1991. Expression of the pea genePsMTA in *E. coli* Metal-binding properties of the expressed protein. *Febs letters.* 292 (1-2): 48-52

Tripathi B.N., Mehta S.K., Amar A., Gaur J.P. 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} . *Chemosphere.* 62: 538–544

Tripathi R.D., Srivastava S., Mishra S., Singh N., Tuli R., Gupta D. K., Maathuis F. J. 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. Trends in biotechnology. 25(4): 158-165

Tripathi R.D, Tripathi P., Dwivedi S., Dubey S., Chatterjee S., Chakrabarty D., Trivedi P.K. 2012. Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. Frontiers in Physiology. 3, 275

Turchia A., Tamantinib I., Camussia A.M., Racchia M.L. 2012. Expression of a metallothionein *At* gene of *Pisum sativum* in white poplar enhances tolerance and accumulation of zinc and copper. Plant Science. 183. 50-56

Udvardi M., Poole P.S. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. Annu. Rev. Plant Biol. 64: 781-805

Van De Mortel J. E., Schat H., Moerland P. D. 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant, Cell and Environment. 31(3): 301–324

Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., Van der Lelie D., Mench, M. 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 16(7): 765-794.

Vázquez S. Agha R, Granado A., Sarro M.J., Esteban E., Peñalosa J.M., Carpena R.O. 2006. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. Water, Air, and Soil pollution 177: 349–365.

Verbruggen N., Hermans C. 2009. Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids. 35: 753-759

Vogeli-Lange R., Wagner G.J. 1990. Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves: Implication of a Transport Function for Cadmium-Binding Peptides. Plant Physiol. 92:1086-1093

Wang S.H., Zhang H., Zhang Q., Jin G.M., Jiang S.J., Jiang D., He Q.Y., Li Z.P. 2011. Copper-Induced Oxidative Stress and Responses of the Antioxidant System in Roots of *Medicago sativa*. J. Agronomy & Crop Science. 197, 418–429

Wevar-Oller A.L., Agostini E., Talano M.A., Capozucca C., Milrad S.R., Tigier, H., Medina M.I. 2005. Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Sci.* 169 (6): 1102-1111.

White C.N y Rivin C.J. 1995. Characterization and expression of cDNA encoding a seed-specific metallothionein in maize. *Plan Physiol.* 108: 831-832

WHO. Arsenic in drinking waters. 2011

Wildner G. F., Henkel J. 1979. The effect of divalent metal ions on the activity of Mg²⁺ depleted ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase. *Planta.* 146(2): 223–228

Wilson B., Pyatt F.B. 2007. Heavy metal bioaccumulation by the important food plant, *Olea europaea* L., in an ancient metalliferous polluted area of Cyprus. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 78: 390–394

Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology.* 5:218–223

Wolf S., Hématy K., Höfte H. 2012. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 381-407

Wong H.L., Sakamoto T., Kawasaki T., Umemura K., Shimamoto K. 2004. Down-Regulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small GTPase OsRac1 in Rice. *Plant Physiology.* 135(3): 1447-1456

Wongsamuth R., Doran P.M. 1997. Hairy roots as an expression system for production of antibodies. *Hairy roots culture and application.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 89–97

Xu X.Y., McGrath S.P., Zhao F. J. 2007. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist.* 176(3): 590-599

Yadav S. K., Singla-Pareek S. L., Reddy M. K., Sopory S. K. 2005. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Letters.* 579 (27): 6265–6271

Yadav S.K., Singla-Pareek S.L., Reddy M.K., Sopory S.K. 2005. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and

maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Lett.* 579: 6265-6271

Yadav S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany.* 79 (2): 167-179

Yamaguchi M., Valliyodan B., Zhang J., Lenoble M.E., Yu O., Rogers E.E., Nguyen H.T., Sharp R.E. 2010. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant, Cell and Environment*, 33: 223–243

Yang S.X., Deng H., Li M.S. 2008. Manganese uptake and accumulation in a woody hyperaccumulator, *Schima superb.* *Plant Soil Environ.* 54: 441–446

Yang X. E., Jin X. F., Feng Y., Islam E. 2005. Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology.* 47(9): 1025–1035

Yang Z, Chu C. 2011. Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. En “Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations”, Prof. Arun Shanker (Ed.), pp. 59-78. ISBN: 978-953-307-394-1, InTech, DOI: 10.5772/24204

Yoshihara T., Yamaguchi K., Takamatsu S., Sakamura S. 1981. A New Lignan Amide, Grossamide, from Bell Pepper (*Capsicum annum* var. *grosswn*). *Agric. Biol. Chem.*, 45 (II), 2593-2598

Yruela I. 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (1). 145-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>

Zhang L., Koay M., Maher M.J., Xiao Z., Wedd A.G. 2006. Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded CuICII forms. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (17): 5834-5850

Zhang X. H., Li B., Hu Y. G., Chen L., Min D. H. 2014. The Wheat E Subunit of V-Type H⁺-ATPase Is Involved in the Plant Response to Osmotic Stress. *International journal of molecular sciences.* 15(9): 16196-16210

Zhao H., Yang H. 2008. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Horticulturae*. 16(4).442-447

Zhao F.J., Ma J.F., Meharg, A.A., McGrath S.P. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181: 777–794. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x

Zhao F.J., McGrath S.P., Meharg A.A. 2010. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:535–59

Zhen Y., Qi J. L., Wang S. S. 2007. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiologia Plantarum*. 131(4): 542–554

Zhou Z.S., Wang S.J., Yang Z.M. 2007. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*.70:1500–1509

Zhou M.L., Tang Y.X., Wu Y.M. 2013. Plant hairy roots for remediation of aqueous pollutants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31: 1-8

Zhu W, Zhao D, Miao Q, Xue T, Li X, Zheng C. 2009. *Arabidopsis thaliana* metallothionein, *AtMT2a*, mediates ROS balance during oxidative stress. *J Plant Biol* 52: 585–592

Zhuang P., Yang Q., Wang H., Shu W. 2007. Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water Air Soil Pollut.* 184: 235–242

Zimeri A.M., Dhanker O.P., McCaigh B., Meagher R.B. 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol. Biol.* 58: 839–855

Zribi K., Nouairi I., Slama I., Talbi-Zribi O., Mhadhbi H. 2014. *Medicago sativa* - *Sinorhizobium meliloti* Symbiosis Promotes the Bioaccumulation of Zinc in Nodulated Roots. *International Journal of Phytoremediation*. 17 (1): 49-55